

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Antoniella Souza Gomes

EFEITO PROTETOR DO LIPOPOLISSACARÍDEO DA *Escherichia coli*
NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - ENVOLVIMENTO
DA CICLOXIGENASE DO TIPO 2, DA NO SINTASE INDUZIDA E DOS CANAIS
DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP.

FORTALEZA - CEARÁ
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

EFEITO PROTETOR DO LIPOPOLISSACARÍDEO DA *Escherichia coli*
NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - ENVOLVIMENTO
DA CICLOXIGENASE DO TIPO 2, DA NO SINTASE INDUZIDA E DOS CANAIS
DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP.

Antoniella Souza Gomes

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA - CEARÁ
2005

Antoniella Souza Gomes

**EFEITO PROTETOR DO LIPOPOLISSACARÍDEO DA *Escherichia coli*
NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - ENVOLVIMENTO
DA CICLOXIGENASE DO TIPO 2, DA NO SINTASE INDUZIDA E DOS CANAIS
DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador:
Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**

FORTALEZA -CEARÁ

200

**EFEITO PROTETOR DO LIPOPOLISSACARÍDEO DA *Escherichia coli*
NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - ENVOLVIMENTO
DA CICLOXIGENASE DO TIPO 2, DA NO SINTASE INDUZIDA E DOS CANAIS
DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP.**

Antoniella Souza Gomes

Aprovada com louvor

30 de junho de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
(Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará
(USP- SP)

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos
(UFC)

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do
Câncer
(LAFICA)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará (UFC)**

Gomes, Antoniella Souza

Efeito protetor do lipopolissacarídeo da *Escherichia coli* na lesão gástrica por indometacina em ratos - envolvimento da ciclooxigenase do tipo 2, da no sintase induzida e dos canais de potássio sensíveis ao ATP/ Antoniella Souza Gomes – Fortaleza. 2005.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Lipopolissacarídeo da *Escherichia coli* 2. lesão gástrica 3. canais de potássio sensíveis ao ATP I. Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte de (orientador) II. Título

À DEUS,
À meus pais,
A minha família,
Ao Marcelo
dedico com muito amor.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – Antiinflamatórios não esteroidais.

AMINO – Aminoguanidina.

ADP – Adenosina difosfato.

ATP – Adenosina trifosfato.

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina.

COX – Ciclooxigenase.

DEXA – Dexametasona.

EPM – Erro padrão da média.

Kg – Kilograma.

H. pylori – Helicobacter pylori.

H. felis – Helicobacter felis.

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio.

IL – Índice de lesão.

IL-1 – Interleucina 1.

IL- 4 – Interleucina 4.

IL- 6 – Interleucina 6.

IL- 8 – Interleucina 8.

IL- 10 – Interleucina 10.

L-NAME – L-nitro-arginina-metil-éster.

L-NIL – L-lisina-N-iminoetil.

LPS - Lipopolissacarídeo

mg – miligrama.

mL – mililitro.

mm – milímetro.

MPO – Mieloperoxidase.

NO – Óxido nítrico.

NO- AINEs - Antiinflamatórios não esteroidais com uma molécula de óxido nítrico.

NOS - Sintase do óxido nítrico.

NOSc - Sintase constitutiva do óxido nítrico.

NOSi - Sintase induzida do óxido nítrico.

NOSn - Sintase neuronal do óxido nítrico.

PAF – Fator antiplaquetário.

PGE2 – Prostaglandina E2.

PGF1 α - Prostaglandina F1 α .

PGI2 – Prostaglandina I2.

PGs – Prostaglandinas.

SNAP - S-nitroso-acetilpenicillamina.

SUR – Receptores da sulfoniluréia.

TGI – Trato gastrintestinal.

TNF- α - Fator de necrose Tumoral α .

Tris – Hidroximetil aminometano.

μ L – microlitro.

μ m - Micromêtro

RESUMO.

INTRODUÇÃO: O papel do LPS na defesa da mucosa gástrica ainda não está estabelecido. **OBJETIVOS:** 1-Verificar o efeito protetor do LPS na lesão gástrica (LG), na infiltração de neutrófilos (IN), no aumento da adesão leucocitária, na diminuição dos níveis de GSH induzidos por indometacina (INDO) em ratos; 2-Investigar o papel da COX-2, NOSi e dos canais de K sensíveis ao ATP (KATP) na gastroproteção do LPS na gastropatia por INDO. **MÉTODOS:** Os ratos foram tratados com LPS da *E. coli* (30, 100 ou 300 µg/Kg, e.v.). Após 6 hs, foi administrado INDO (20mg/Kg, p.o.). Decorridas 3 hs, o sangue foi colhido para determinação do leucograma. Posteriormente, os ratos foram sacrificados e a LG foi aferida. Fragmentos do estômago foram retirados para avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e determinação dos níveis de glutathiona (GSH). A adesão e o rolling dos leucócitos foram avaliados por microscopia intravital. Diferentes grupos foram tratados com rofecoxib, L-NAME, aminoguanidina, dexametasona, glibenclamida, diazóxido ou glibenclamida + diazóxido. Após 3 horas da administração de INDO (20mg/Kg, p.o.), foram avaliadas a LG, a MPO e GSH. **RESULTADOS:** LPS reduziu a LG e o aumentou a MPO induzidas por INDO de forma dose-dependente, com o efeito máximo na dose de 300 µg/Kg e no tempo de 6 hs. O pré-tratamento com LPS induziu uma neutrofilia na gastropatia induzida pela INDO. LPS reverteu à queda dos níveis de GSH no estômago com INDO. O tratamento com LPS diminui a adesão e aumentou o rolling dos leucócitos quando comparado com o tratado com INDO. Rofecoxib, L-NAME, aminoguanidina ou dexametasona não reverteram o efeito protetor do LPS. Glibenclamida, mas não diazóxido, reverteu o efeito protetor do LPS na gastropatia induzida por INDO, aumentando de forma significativa a LG, MPO e diminuindo a GSH. A associação de glibenclamida com diazóxido não reverteu o efeito protetor do LPS. **CONCLUSÕES:** LPS protege contra a LG por INDO, através da inibição da IN por uma diminuição da adesão de leucócitos ao endotélio e por um aumento dos níveis de GSH no estômago. Este evento dependente da abertura de KATP. Nossos dados também sugerem que a atividade de COX-2 e NOSi não estão envolvidos no efeito protetor do LPS.

ABSTRACT.

INTRODUCTION: The role of the LPS in the defense of the gastric mucosa is still not established. **AIMS:** 1-To verify the protective effect of the LPS in the gastric damage (GD), in the neutrophil infiltration (NI), in the increase of the leukocyte of adhesion, in the reduction of the induced glutathione levels for indomethacin (INDO) in rats; 2- To investigate the role of the COX-2, NOSi and of ATP-sensitive k channels (KATP) in the protective effect of LPS administration on INDO- induced gastropathy. **METHODS:** The rats were treated with LPS of *E. coli* (30, 100 or 300 mg/Kg, e.v.). After 6 hs, INDO was administrated (20mg/Kg, p.o.). Three hs later, the blood was harvested for determination the total and differential number of white blood cell counts. Later, the rats had been sacrificed and the GD was surveyed. Piece of the stomach had been removed for evaluation of the myeloperoxidase (MPO) activity and determination of the glutathione (GSH) levels. The adhesion and rolling of the leukocytes had been evaluated by intravital microscopy. Different groups were treated with rofecoxib, L-NAME, aminoguanidine, dexamethasone, glibenclamide, diazoxide or glibenclamide + diazoxide. After 3 hs of the administration of INDO (20mg/Kg, p.o.), had been evaluated the GD, MPO and GSH. **RESULTS:** LPS reduced dose- dependently INDO- induced GD and increase in MPO, with the maximal effect at the dose of 300 µg/kg and in the time of 6 hs. The LPS treatment neutrophilia induced in INDO induced gastropathy. LPS reverted to the fall of the GSH levels in the stomach with INDO. The LPS treatment decreased the adhesion and increased rolling of the leukocytes when compared with the INDO treated. Rofecoxib, L-NAME, aminoguanidine or dexamethasone had not reverted the protective effect of the LPS. Glibenclamide, but not diazoxide, reverted the protective effect of the LPS in the induced gastropathy for INDO, increasing of significant form the GD, MPO and decreasing the GSH. The diazoxide + glibenclamide association of with did not revert the protective effect of the LPS. **CONCLUSIONS:** LPS protects against INDO induced GD, through the inhibition of the NI for a reduction of the adhesion of leukocytes to the endothelin and for an increase of the GSH levels in the stomach. This dependent event of the

KATP opening. Our data also suggest that the activity of COX-2 and NOSi are not involved in the protective effect of the LPS.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Esquema representativo dos vários componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs.	13
Figura 2- Paquímetro digital utilizado para a medida das extensões das lesões.	32
Figura 3- Efeito do tratamento do LPS de <i>E. coli</i> na lesão gástrica induzida por indometacina em ratos.	45
Figura 4- Efeito do tratamento do LPS na lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos – Dose resposta.	46
Figura 5- Efeito do tratamento do LPS na lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos – Tempo resposta.	47
Figura 6- Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com LPS.	49
Figura 7- Efeito do LPS de <i>E. coli</i> na diminuição da adesão leucocitária induzida por indometacina.	50
Figura 8- Efeito do LPS de <i>E. coli</i> no aumento do rolling dos leucócitos induzido por indometacina.	51
Figura 9- Efeito do tratamento com L-NAME na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	55

Figura 10- Efeito do tratamento com aminoguanidina (AMINO) na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	56
Figura 11- Efeito do tratamento com rofecoxib na proteção do LPS à lesão gástrica e o aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	57
Figura 12- Efeito do tratamento com dexametasona (DEXA) na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	58
Figura 13- Efeito do tratamento com glibenclamida na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	59
Figura 14- Efeito do tratamento com diazóxido na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	60
Figura 15- Efeito do tratamento com diazóxido no efeito da glibenclamida na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos.	61
Figura 16- Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados glibenclamida e diazóxido mais glibenclamida.	63

Tabela 1- Efeito protetor do LPS de <i>E. coli</i> na contagem de leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico de ratos tratados com indometacina.	48
Tabela 2 – Efeito dos canais de potássio sensíveis a ATP na contagem de leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico de ratos no efeito protetor do LPS na lesão gástrica induzida por indometacina.	62

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1.0- INTRODUÇÃO.	1
1.1- Lipopolissacarídeo (LPS).	4
1.2- Inflamação.	5
1.3- Lesão gástrica por antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs).	8
1.4- Fisiopatologia da Lesão Gástrica por AINEs .	12
1.5- Indometacina.	15
1.6- LPS e a lesão gástrica.	16
1.7- Óxido nítrico, LPS e a lesão gástrica.	17
1.8- Canais de potássio sensíveis a ATP (Canais KATP), LPS e a lesão gástrica.	24
2.0- OBJETIVOS.	26
3.0- MATERIAS E MÉTODOS.	28
3.1- Animais.	28
3.2 - Aparelhos e instrumentos laboratoriais.	28
3.3- Drogas.	29
3.4- Corantes.	29
3.5 - Soluções.	29
3.6- Efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos - Curva dose resposta.	33
3.7- Efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos - Curva tempo resposta.	34
3.8- Leucograma.	35

3.9- Determinação do rolling e a adesão de neutrófilos na microcirculação mesentérica por microscopia intravital.	36
3.10- Determinação dos níveis de Glutathione (GSH) no estômago.	37
3.11- Papel do óxido nítrico (NO) no efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	36
3.12- Papel da COX-2 no efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	38
3.13- Efeito da dexametasona no papel protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	39
3.14- Papel dos canais de potássio sensíveis a ATP na proteção do LPS à lesão gástrica por indometacina em ratos.	40
3.15- Avaliação da atividade da Mieloperoxidase no estômago.	41
3.16- Análise estatística.	42
4.0- RESULTADOS.	43
4.1- Efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos - Curva dose resposta.	43
4.2- Efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos - Curva tempo resposta.	43
4.3- Leucograma.	44
4.4- Determinação dos níveis de Glutathione (GSH) no estômago.	44
4.5- Determinação do rolling e a adesão de neutrófilos na microcirculação mesentérica por microscopia intravital.	44
4.6- Papel do óxido nítrico (NO) no efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	52
4.7- Papel da COX-2 no efeito protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	52
4.8- Efeito da dexametasona no papel protetor do LPS na lesão gástrica por indometacina em ratos.	53
4.9- Papel dos canais de potássio sensíveis a ATP na proteção do LPS à	53

lesão gástrica por indometacina em ratos.

5.0- DISCUSSÃO.	64
6.0- CONCLUSÃO.	78
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	80
8.0- ANEXO	99

1.0- Introdução

Com o incremento da industrial farmacêutica, nas últimas seis décadas, os medicamentos passaram a ocupar, de forma crescente, lugar de destaque como alternativa para a cura das doenças e alívio dos sintomas. Por isso, os produtos farmacêuticos passaram a sofrer um uso indiscriminado e irracional. Esse uso indiscriminado, obviamente, termina por acarretar conseqüências negativas importantes nos indivíduos traduzidos, particularmente, pelo aumento de efeitos colaterais ou reações adversas, por vezes bastante graves (BARROS, 1984).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são os medicamentos mais prescritos no mundo, sendo a toxicidade gastrintestinal a maior limitação para o seu uso. Em todo o mundo, mais de 75 milhões de prescrições de antiinflamatórios não-esteroidais - AINEs são emitidas ao ano. Nos Estados Unidos, Tylenol®, Advil® e Aspirina® são muito consumidas. Entretanto, o uso indiscriminado desses medicamentos levou a uma série de complicações. O resultado disso é que mais de 100 mil pessoas são hospitalizadas por conta do uso indevido dessas drogas; e cerca de 16.500 pessoas morrem por ano. Os dados constam no artigo publicado pelo *New England Journal of Medicine*, em 1997.

No Brasil não se têm dados muito precisos, mas sabe-se que os antiinflamatórios também estão entre as drogas mais consumidas e sem prescrição médica, pela população. Além daquelas drogas citadas anteriormente, outras drogas da categoria dos AINEs fazem parte do cotidiano brasileiro, como

por exemplo, os AINEs derivados da ácido idolacéticos. Quando prescritas por médicos, com paciente acompanhado e monitorado, são altamente resolutivas, Por outro lado, quando tomados de forma indiscriminada aumentam significativamente o risco de complicações gastrointestinais graves entre os usuários. Esses fatores de risco incluem antecedentes pessoais de complicações TGI graves associadas à úlcera induzida por AINE, uso concomitante de anticoagulante, idade avançada e uso de múltiplos e diferentes AINEs em altas doses. No entanto, os sintomas, ou a falta deles, não são bons sinais de eventos gastrointestinais graves. De fato, 30% a 40% dos pacientes com úlceras induzidas por AINEs são assintomáticos e, entre aqueles que desenvolvem hemorragia digestiva, até 60% o fazem silenciosamente, em contraste com os 25% de hemorragias assintomáticas observadas nos não-usuários de antiinflamatórios (COELHO, 1998).

Tem sido sugerido ainda que a maioria dos pacientes usuários de AINEs não desenvolvem lesão gastrintestinal, pois a sua mucosa gástrica seria capaz de se adaptar criando resistência à agressões pelos AINEs. A falha deste mecanismo de adaptação seria a chave para o entendimento do desenvolvimento de lesões gástricas por AINEs em pacientes susceptíveis (OLIVERO & GRAHAM, 1992). Através de um fenômeno de adaptação, inúmeros produtos químicos podem induzir uma proteção da mucosa gástrica a lesão por AINEs ou por etanol (PESKAR et al., 2002). Tem sido descrito que o envolvimento de várias vias, como COX-2 (MIYAKE et al., 2002; SOUZA et al, 2003), NO sintase induzida (TAKEUCHI et al., 1999) e mais recentemente os canais de K sensíveis ao ATP

(canais de KATP) (PESKAR et al., 2002) entre outros, estão envolvidos neste fenômeno de adaptação.

1.1- Lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede das bactérias Gram negativas está envolvido no desencadeamento da maioria dos fenômenos fisiopatológicos envolvidos na infecção por estas bactérias.

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente; lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo. O peptidoglicano, responsável pela forma das células e proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e interno, confere rigidez ao corpo bacteriano (BURNETT & SCHUSTER, 1974). A lipoproteína está ligada de modo covalente ao peptidoglicano e não covalente à membrana externa; sua função é estabilizar a membrana externa e ancorá-la à camada de peptidoglicano. A membrana externa é uma dupla camada, contendo fosfolípidos e proteínas e apresentando, em sua camada externa, o lipopolissacarídeo. Quimicamente, a endotoxina das bactérias gram-negativas é um lipopolissacarídeo (LPS), que tem na sua porção mais interna um lípido A, seguido do *core* e, na região externa, o antígeno O, composto por cadeias repetidas de oligossacarídeos. O lípido A é a porção responsável pela toxicidade

da molécula e é antigenicamente conservado entre as bactérias gram-negativas patogênicas (BURNETT & SCHUSTER, 1974).

O lipopolissacarídeo (LPS) é o maior fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Esta endotoxina é um antígeno fraco não específico que não é facilmente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar a cascata do complemento. A ativação do complemento envolve a formação de cininas, outros importantes mediadores da inflamação. Também ativa: plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. O LPS induz os macrófagos a secretarem as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- α), óxido nítrico, interferons, fator ativador de plaquetas (PAF) e prostaglandinas (BURNETT & SCHUSTER, 1974; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

1.2- INFLAMAÇÃO

A inflamação constitui o principal mecanismo de defesa do organismo as alterações do meio. Constantemente, a superfície da mucosa do trato gastrointestinal é exposta a estímulos lesivos como drogas, toxinas bacterianas, proteínas heterólogas e suco gástrico. Estes estímulos lesivos determinam o aparecimento de uma reação inflamatória coordenada por vários mediadores liberados por células do epitélio e da lâmina própria, tendo como consequência final o desenvolvimento de lesões na mucosa e o aparecimento de doenças como, por exemplo, esofagite, gastrite, úlcera péptica e diarreia (KATZUNG, 1998).

Por ser um mecanismo de defesa natural do organismo a qualquer agressão eventualmente sofrida, sua intensidade mostra-se diretamente proporcional ao tamanho do trauma sofrido. A resposta inflamatória costuma ser dividida em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica (KATZUNG, 1998). Segundo Wanmacher e Ferreira (1995), a inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual; é mediada pela liberação de autacóides e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune (WANMACHER & FERREIRA, 1998). A resposta imune surge quando as células imunes são ativadas e liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. A inflamação crônica (quadro proliferativo) caracteriza-se pela duração prolongada, sendo que ocorrem simultaneamente a inflamação ativa, a destruição tecidual e as tentativas de cicatrização. Cortes histológicos demonstram uma infiltração de células, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos; destruição tecidual; e reposição do tecido conjuntivo da lesão por um processo envolvendo angiogênese e fibrose (ALLE & ALLE-FILHO, 1992).

A resposta inflamatória celular é um mecanismo pelo qual o organismo se defende contra infecções e repara danos teciduais. Porém, se a inflamação persistir, esta se torna patológica e causa danos ao hospedeiro. A resposta inflamatória pode ser gerada a partir de células como os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, plaquetas e endotélio e também proteínas circulantes que em sua maioria são componentes da coagulação, da fibrinólise e das vias da cinase.

Para que se possa ativar rapidamente a resposta inflamatória celular e proteger o organismo dos mediadores inflamatórios celulares estes são pré-formados e estocados. As células participantes da resposta inflamatória podem ser categorizadas em: circulantes de vida curta (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e não-circulantes de vida longa (macrófagos e mastócitos). Os neutrófilos e macrófagos têm como função primária a fagocitose. Essas células funcionam como uma barreira entre o ambiente e o hospedeiro caso uma partícula ou organismo tente adentrar nele (Weiss, 1989). Os mastócitos e basófilos têm como função principal a secreção de mediadores inflamatórios. Essas células contêm além dos mediadores, que aumentam a permeabilidade celular, fatores quimiotáticos que são responsáveis por recrutar outras células inflamatórias.

Castilho e colaboradores afirmaram que a lesão celular associada à inflamação atua sobre as membranas celulares, provocando a liberação de enzimas lisossômicas pelos leucócitos. Depois, ocorre liberação de ácido araquidônico, a partir de compostos precursores, e vários eicosanóides são sintetizados (CASTILHO et al., 1998). De acordo com Schutz e colaboradores, as prostaglandinas exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação (SCHUTZ, 1997).

1.3- LESÃO GÁSTRICA POR ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES)

AINEs são hoje considerados como uma causa estabelecida de úlcera péptica, podendo ocorrer após administração oral ou sistêmica das drogas e com praticamente todos os antiinflamatórios (SINGH et al., 1996). Acredita-se que

AINEs promovem lesão gastroduodenal por dois mecanismos independentes, ou seja, diretamente por efeito tóxico direto, em nível epitelial, sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, resultando em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa, e, sistemicamente, enfraquecendo os mecanismos de defesa através da inibição da cicloxigenase, enzima chave na síntese das prostaglandinas (WALLACE, 2000). Desta forma, AINEs causam uma redução significativa nos teores de prostaglandinas das mucosas. Sabe-se que as prostaglandinas, especificamente a PGI_2 e PGE_2 , protegem a mucosa gástrica através de seus efeitos estimulantes sobre a produção de muco e secreção de bicarbonato, enquanto aumentam o fluxo sangüíneo mucoso e reduzem turnover celular (WALLACE, 2000).

As PGs constituem uma família de ácidos carboxílicos de cadeia linear, um anel ciclopentânico e graus variáveis de insaturação. Todas as PGs são produzidas a partir dos ácidos graxos livres: eicosatrienóico, araquidônico e eicosapentanóico. A formação das PGs inicia-se com a ativação da fosfolipase A2 que pode ser provocada por estímulos fisiológicos (angiotensina, bradicinina, noradrenalina) ou por estímulos patológicos (lesão tissular). Após sofrer ativação, a fosfolipase A2 cliva o ácido araquidônico da membrana que pode, dessa forma, ser metabolizado pela lipoxigenase, pela ciclooxigenase ou pela lysil PAF. A via da lipoxigenase tem como produtos finais de metabolização diferentes tipos de leucotrienos e a via da ciclooxigenase tem como produtos finais de metabolização as PGs. Por outro lado, a via do lysil PAF leva a produção de plaquetas (WALLACE, 1997).

No início da década de 1990, foi estabelecida a presença de pelo menos duas isoformas da COX, denominadas COX-1 e COX-2 (XIE et al., 1991; VANE et al., 1994). Apesar de apresentarem a mesma função, pesos moleculares semelhantes e similaridade na seqüência de aminoácidos, estas isoenzimas são codificadas por genes diferentes e apresentam modelos de expressão também diferentes (HALTER et al., 2001). A COX-1, também chamada de constitutiva está presente em grande quantidade na maioria dos tecidos e de fundamental importância na proteção da mucosa gástrica, enquanto a COX-2, chamada de indutiva, aparece em quantidades baixas sob condições basais, mas sua expressão é induzida por estímulos inflamatórios como fatores de crescimento (FC), citocinas e injúria tissular (XIE et al., 1991; WALLACE, 1997).

Em situações de dano tecidual, transformações malignas ou inflamatórias, a COX-2 tem sua expressão aumentada por substâncias como mitógenos, citocinas e endotoxinas. Isto tem permitido propor que a COX-1 está relacionada com efeitos fisiológicos, responsáveis pela homeostase corporal, enquanto a COX-2 está relacionada com efeitos patológicos como a inflamação (VANE & BOTTING, 1995).

A organização mundial da saúde classifica os AINEs seletivos para COX2 em dois grupos. O primeiro é chamado de grupo dos coxibs representados pelo rofecoxib, celecoxib entre outros (SCOTT & LAMB, 1999). O segundo grupo é formado por AINEs utilizados há certo tempo e, após passarem por testes de seletividade, demonstram serem seletivos para isoenzima indutiva. Fazem parte deste grupo a nimesulida, meloxicam e nalbumeona. O celecoxib e rofecoxib

quando submetidos aos testes de seletividade para COX, mostraram ação seletiva para isoenzima indutiva. Uma vez determinado a seletividade destes medicamentos, têm sido realizados estudos tanto em animais quanto em seres humanos com o objetivo de se verificar a ação protetora destes medicamentos sobre a mucosa gástrica (CHAN et al., 1995, CHAN et al., 1999, SIMON, 1999). Embora alguns estudos agudos e crônicos envolvendo essas drogas demonstrem uma certa habilidade destes medicamentos em não alterar a síntese de PG no estômago, reduzir a incidência de lesão sobre a mucosa do TGI e diminuir a anemia originada por sangramento gástrico, não há estudos epidemiológicos que avaliem de modo conclusivo tais efeitos ficando claro a necessidade de estudos prospectivos com tais medicamentos (HAWKEY, 2001). Recentemente foi demonstrado que o uso de coxibs estão relacionados ao aumento de incidência de eventos cardíacos. Os resultados obtidos demonstraram maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares trombóticos com o uso do rofecoxib, incluindo infarto do miocárdio, angina instável, trombos cardíacos, morte súbita, ataques isquêmicos e ataques isquêmicos transitórios (Mukherjee et al., 2001).

Em estudos agudos em humanos, Hawkey (2001) demonstrou que o rofecoxib, quando utilizado em doses supratrapêuticas (250 mg/dia), não diminui a síntese de PGs quando comparado com o placebo. Por outro lado, houve redução de PGs entorno de 70 % nos pacientes que utilizaram naproxeno (500mg/dia) (HAWKEY, 2001). Simont e colaboradores (2001) avaliaram os efeitos induzidos por rofecoxib. Rofecoxib reduziu em 54% eventos clínicos no TGI

(dispepsia, dor abdominal e desconforto epigástrico) quando comparado com o naproxeno. Seus efeitos protetores da mucosa gástrica foram maiores quando analisados sintomas de complicações no TGI (ulcerações, obstruções e perfurações) e sangramentos, os quais foram reduzidos em 57% e 62 %, respectivamente, em relação ao naproxeno (SIMON et al., 2001).

Apesar de alguns estudos demonstrarem a baixa incidência de efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica de humanos induzidos por inibidores seletivos para COX-2, estudos realizados em ratos têm demonstrado que a COX-2 desempenha um papel importante na proteção da mucosa gástrica. Brzozowski e colaboradores demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia reperusão (BRZOZOWSKI et al., 1999). Wallace e colaboradores mostraram que um inibidor seletivo da COX-1 (SC-560) reduziu o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, sem alterar a adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas ou causar lesões gástricas. Por outro lado, um inibidor seletivo da COX-2 (celecoxib) causou um aumento da adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas, sem alterar fluxo sanguíneo na mucosa gástrica ou causar lesões gástricas. Somente com a administração concomitante de inibidores seletivos para COX-1 e COX-2 foi possível desencadear lesões gástricas (WALLACE et al., 2000). Ademais, Konturek e colaboradores demonstraram que durante a adaptação da mucosa gástrica à aspirina ocorre um aumento da expressão de COX-2, num mecanismo compensatório (KONTUREK et al., 1998). Foi observado que camundongos *Knockout* para COX1 desenvolve erosões gástrica por indometacina, um dos mais potentes AINEs, mostrando que outros

mecanismos além da inibição da síntese de PGs, podem estar envolvidos nesse fenômeno (LANGENBACH, 1995). Recentemente, Miyake e colaboradores observaram que no curso de uma reação inflamatória gástrica ocorreu um aumento da expressão de COX-2 e uma adaptação da mucosa a lesão por etanol (MIYAKE et al., 2002). Souza e colaboradores demonstraram que o efeito protetor da gastrite por iodocetamina em ratos é inibido pelo rofecoxib (SOUZA et al., 2003).

1.4- FISIOPATOLOGIA DA LESÃO POR AINES

Apesar do principal mecanismo envolvido na toxicidade gástrica dos AINEs ser a capacidade destas drogas em inibirem a síntese de prostaglandinas, via inibição da ciclooxigenase, nas últimas décadas houve um grande acúmulo de conhecimentos a cerca dos mecanismos e mediadores inflamatórios envolvidos lesão gastrintestinal associada ao uso de AINEs.

Há vários anos, já se conhecia a capacidade dos AINEs em reduzir o fluxo sangüíneo na mucosa gástrica (KITAHORA et al., 1987; GANA et al., 1986). Entretanto, o conhecimento da existência da lesão no endotélio vascular decorrente da administração dos AINEs é relativamente recente. Este tipo de lesão é semelhante à lesão gástrica observada em modelos de isquemia e reperfusão, onde neutrófilos tem um papel importante (WALLACE, 1997). Em 1993, Wallace e colaboradores desenvolveram os primeiros trabalhos demonstrando o papel dos neutrófilos na gênese da lesão gastrintestinal por AINEs (WALLACE et al., 1993). Eles mostraram que a indometacina, um dos

antiinflamatórios não esteroidais mais potentes, foi capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio na microcirculação gástrica e mesentérica em ratos e que a neutropenia induzida por metotrexate ou pelo soro anti-neutrofilico inibiram a lesão gástrica induzida por AINEs (WALLACE et al., 1990). Em 1991, o mesmo grupo mostrou que o uso de anticorpos monoclonais contra a subunidade β do complexo de proteínas de adesão CD11/CD18 inibiu a lesão causado por AINEs (WALLACE et al., 1991). Consistentes com esses dados foram os resultados de vários estudos que examinaram o mecanismo molecular que levaria ao aumento da adesão dos neutrófilos ao endotélio induzidas pelos AINEs. Assim, a expressão de proteínas de adesão endoteliais, ICAM-1 e P-selectina, estavam aumentadas no modelo de gastropatia induzida por AINEs (MORISE et al., 1998). Em 1999, Morise e colaboradores mostraram que camundongos deficientes para CD18 ou ICAM-1 ou P-selectina apresentaram uma lesão gástrica menor do que os animais não deficientes, demonstrando a importância da expressão destas proteínas de adesão na gênese da lesão gástrica por AINEs (MORISE et al., 1999).

Acredita-se que o TNF- α seja um outro mediador importante na gastropatia induzida por AINEs. Foi demonstrado que a inibição da síntese de prostaglandinas por AINEs é capaz de aumentar a produção de TNF- α (UTSUNOMIYA et al., 1994; MARTICH et al., 1991; GONCALVES DE MORAES et al., 1996). Santucci e colaboradores demonstraram que drogas que diminuem a produção de TNF- α protegem a mucosa gástrica e previnem a infiltração de neutrófilos induzidas pela administração de indometacina e substâncias que aumentam a produção de TNF-

α provocam o aumento tanto da lesão gástrica quanto da infiltração de neutrófilos induzidos pela indometacina (SANTUCCI et al., 1995). Demonstrando que apesar do TNF- α ter um papel fundamental na gênese da lesão por AINEs parece não ser secundário a uma inibição na adesão dos leucócitos ao endotélio (APPLEYARD et al., 1996). Recentemente, Souza e colaboradores demonstraram em um modelo de lesão gástrica por indometacina em camundongos que o tratamento com fucoidina reduziu a lesão gástrica e a infiltração de neutrófilos induzidos por indometacina (SOUZA et al., 2004).

Com base nos conhecimentos produzidos, Wallace, propôs um esquema para representar os eventos envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica induzida por AINEs (figura 1).

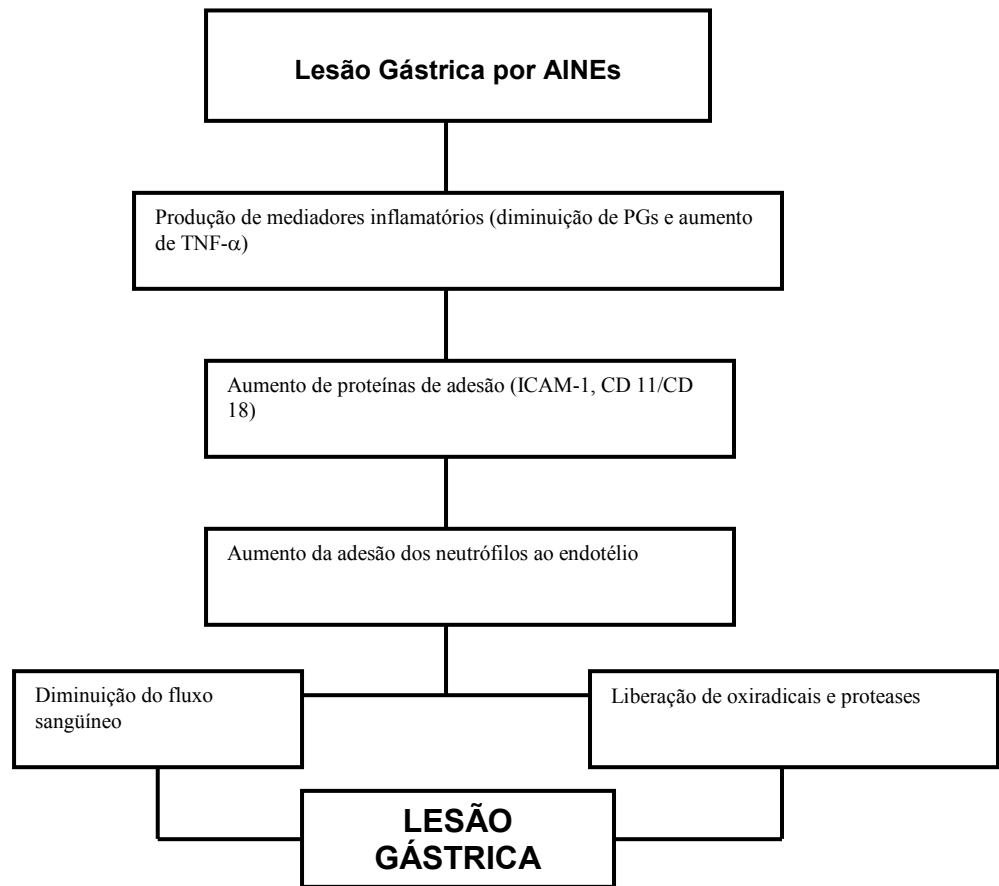


Figura 1 – Esquema representativo dos vários componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs (WALLACE, 1997).

1.5- INDOMETACINA

A indometacina é um antiinflamatório não esteroide derivado do ácido indolacético. Inibe a atividade da enzima ciclooxigenase para diminuir a formação de precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico e inibe, também, a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares (FOWLIE et al., 1996). Embora muitos de seus efeitos terapêuticos e adversos sejam provocados

pela inibição das sínteses de prostaglandinas em diferentes tecidos, outras ações contribuem de forma significativa aos efeitos terapêuticos do medicamento.

A indometacina tem propriedades analgésicas - antipirética e antiinflamatória semelhante aos salicilatos. Possui propriedades analgésicas independentes dos seus efeitos antiinflamatórios. É indicada na fase ativa da artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, alterações músculo esqueléticas (bursite, tendinite), processos inflamatórios posteriores a intervenções ortopédicas (SATOH et al., 1981).

1.6- LPS E A LESÃO GÁSTRICA POR AINEs

O efeito do LPS na defesa da mucosa gástrica não está definido. Por um lado à administração aguda de LPS pode induzir lesão na mucosa do trato gastrintestinal, por outro a administração de altas doses de maneira crônica protegeria a mucosa gástrica a lesão por etanol. Em relação ao efeito do LPS na defesa da mucosa gástrica, foi estabelecido inicialmente que a administração de LPS agudamente levaria a lesão na mucosa gastrintestinal (BOUGHTON-SMITH et al., 1993). Posteriormente, Konturek e colaboradores demonstraram que baixas doses de LPS administrado por via intra-peritoneal inibiram a secreção de pepsina e ácido gástrico e reduziram significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol. Por outro lado, quando aplicado em altas doses, o LPS provocou hipotensão e falha na proteção a lesão gástrica

induzida por etanol (KONTUREK et al., 1998). Ferraz e colaboradores descreveram que a administração de altas concentrações de LPS foi capaz de induzir a expressão de COX-2 e NOS induzida na mucosa gástrica e proteger a lesão gástrica por etanol. Entretanto, Castaneda e colaboradores demonstraram que LPS de forma dose dependente desencadeou um aumento das lesões gástricas induzidas por etanol (CASTANEDA et al., 1999). Assim, pode-se concluir que permanece não totalmente definido um papel do LPS na proteção da lesão gástrica.

1.7- ÓXIDO NÍTRICO, LPS E A LESÃO GÁSTRICA POR AINEs

Recentemente, a descoberta do óxido nítrico (NO) tem chamado a atenção pela participação do mesmo na sinalização de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. O óxido nítrico é um gás não carregado e tem sido demonstrado estar envolvido em processo fisiológicos com relaxamento de músculo liso, neurotransmissão, agregação plaquetária e mecanismo de defesa de hospedeiros. Além disso, NO pode ter uma função na patologia de várias doenças inflamatórias como artrite, miocardite, colites, nefrites e outras condições patológicas como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas.

Em 1980, foi demonstrado que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era mediado por um fator, mais tarde conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT & ZAWADZKI,

1980). Alguns anos depois, em 1987, foi demonstrado que esse fator de relaxamento derivado do endotélio era um gás, o óxido nítrico (NO). Palmer e colaboradores sugeriram que EDRF e óxido nítrico eram equivalente na atividade biológica, estabilidade química e susceptibilidade a inibidores e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina e potencializada por superóxido dismutase (PALMER et al., 1987). Nesse mesmo ano, foi demonstrado que as células endoteliais produzem óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina (KUO & SCHROEDER, 1995).

Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (KUO & SCHROEDER, 1995). O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular. A interação do NO com a guanilil ciclase solúvel ou os produtos de sua reação com oxigênio molecular e radicais superóxidos podem modificar diferentes macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos para produzir tanto efeitos fisiológicos como patológicos (CONGER, 1994).

O NO tem alta afinidade com o grupo heme, encontrado em proteínas intracelulares como, por exemplo, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase e guanilato ciclase e também é capaz de se ligar a grupos -SH, formando tiol (nitrosotiol); é

um gás incolor e estável, moderadamente solúvel em água e sua meia-vida varia de 3 a 60 segundos (PALMER et al., 1987, DAVIES et al., 1995).

Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (eNOS e nNOS) (WONG et al., 1996).

A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) é uma NOS constitutiva, presente em neurônios, células epiteliais, SNC e SNP, sistema NANC, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino, células β pancreática e outros. É cálcio-calmodulina dependente e regula a transmissão sináptica no SNC; atua na regulação central da pressão sangüínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Não é regulada por cálcio. Produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático por inibição de enzimas contendo ferro, também causando fragmentação de DNA. Atua em parasitas e células tumorais. A isoforma III ou óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) é uma NOS constitutiva e produz NO em endotélio vascular sob condições basais. O NO liberado no lúmen vascular é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária na parede vascular e também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, inibe a síntese de DNA, mitogênese e a proliferação de células da musculatura lisa vascular e, também é responsável pela regulação da pressão sangüínea e contratilidade do músculo cardíaco (FORSTERMANN et al., 1994).

O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (KIECHLE et al., 1993).

O NO modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo (ADAMS et al., 1996) e participa de vários fenômenos, como vasodilatação dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano e regulação da pressão sanguínea basal (KIECHLE et al., 1993).

A NOS induzida não é detectável em condições basais. LPS ou outras endotoxinas bacterianas, junto com citocinas, como TNF- α , IL-1 β ou interferons, induzem a síntese de iNOS, de 2 a 4 horas após a exposição ao agente. A indução de iNOS pode ser suprimida por IL-4, IL-10, IL-8 e por glicocorticóides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas (DAVIES et al., 1995).

A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual. Assim, onde a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa (infecção ou sepse), a expressão de iNOS é benéfica; quando a expressão da iNOS é parte da inflamação anormal (não adaptativa), a expressão de iNOS pode ser nociva (doença autoimune) (DAVIES et al., 1995).

O óxido nítrico tem propriedades citoprotetoras no trato gastrointestinal (PALMER et al., 1988). Em relação à mucosa gastrointestinal, recentemente numa

revisão, Wallace propôs que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), mas paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão da mucosa. A presença de NO em baixas concentrações está associado aos efeitos benéficos no TGI, como o aumento na secreção de muco protetor, manutenção da barreira epitelial e da microcirculação e estimulação da reparação da mucosa. Por outro lado, o NO em altas concentrações, pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER et al., 2000). Os inibidores da síntese de óxido nítrico acentuam os danos à mucosa gástrica produzida pela indometacina e por outras AINEs, por reduzir o fluxo sanguíneo na mucosa e restaurar a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (TAVARES-MURTA et al., 1998). Por outro lado, uma outra classe de AINEs, os NO-AINEs (Ex: nitrofenac), aceleram a cicatrização de lesões gástricas induzidas por ácido acético e diclofenaco e não produzem danos gastrointestinais (ELLIOTT et al., 1995). Souza e colaboradores demonstraram que em camundongos deficientes para iNOS não desenvolveram lesão gástrica por AINEs (Souza et al. 2004).

O efeito do LPS na mucosa gastrointestinal pode se caracterizar por algumas divergências na função biológica do óxido nítrico. Salvemini e colaboradores demonstraram que o LPS administrado por via endovenosa produz danos na mucosa do TGI visíveis dentro de três horas após a administração, e que os inibidores de NO (L-NAME e L-NIL) aumentaram a gravidade das lesões enquanto que o uso de doadores de NO não reduziram estes danos. Mas 6 horas após a administração de LPS, quando a expressão dos iNOS estava aumentada o

tratamento com os inibidores de NO preveniu o aumento dos danos na mucosa do TGI (SALVEMINI et al., 1996). Recentemente, Konturek e colaboradores realizaram um estudo comparativo dos efeitos da administração de LP em ratos contra lesões gástricas induzidas por etanol 100%. Com o objetivo de mostrar o efeito gastroprotetor central e periférico do LPS, foram analisados os efeitos do pré-tratamento com inibidores não seletivos da NO sintase (L-NAME) ou inibidores seletivos da NO sintase induzida (L-NIL). Os resultados mostraram que LPS administrado, tanto por i.c.v quanto por i.p., reduziram as lesões gástricas induzidas por etanol, sendo este efeito similar ao observado pela administração de doadores de óxido nítrico. Entretanto, a proteção induzida por LPS foi abolida com o uso de L-NAME e atenuada com o uso de L-NIL. Foi ainda demonstrado que o SNAP (S-nitroso-acetilpenicillamina), um doador de NO, administrado por via intra-peritoneal, preveniu a aparecimento de lesões gástricas induzidas pelo etanol, através do aumento do fluxo sanguíneo pela liberação de NO na mucosa gástrica. A supressão da atividade da NO sintase (NOS) pela L-NAME ou pelo L-NIL reverteu os efeitos protetores do LPS. Foi também observado que LPS e SNAP aumentaram significativamente a produção de PGE₂, sendo que este efeito revertido pelo pré-tratamento com inibidores da NO sintase (KONTUREK et al., 1998). Por outro lado, Padol e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que lipopolisacarídeos purificados de *H. pylori* e *H. felis* aumentaram as secreções ácidas das glândulas gástricas, contribuindo para o desenvolvimento de lesões gástricas em camundongos (PADOL et al., 2001). Ademais, Lamarque e colaboradores demonstraram que a administração de LPS foi capaz de induzir a

expressão da NO sintase em células do epitélio duodenal de ratos *in vivo* (LAMARQUE et al., 2000). Os mesmos autores demonstraram ainda que o LPS, de forma dose dependente, causou um aumento das lesões gástricas, através da diminuição do fluxo sangüíneo na mucosa e aumentou expressão da NOS induzida na mucosa gástrica. A administração de aminoguanidina, um inibidor relativamente seletivo para a NOS induzida, desencadeou uma diminuição da lesão gástrica e um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa induzidos pelo LPS. Assim, acreditamos que ainda permanece não definido o papel da NOS induzida no mecanismo de proteção do LPS a lesão gástrica por AINEs.

1.8- CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (CANALIS de KATP), LPS E A LESÃO GÁSTRICA POR AINEs

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (canais de KATP) representam a maior e mais diversificada família de canais iônicos do corpo. Foi descoberto originalmente no coração (TERZIC et al., 1995) e encontradas mais tarde em muitos outros tecidos como no pâncreas (ASHCROFT et al., 1984, RORSMAN & TRUBE, 1985), músculo esquelético (SPRUCE et al., 1985), músculo liso (STANDEN et al., 1989) e cérebro (ASHFORD et al., 1988). Apresentam também uma atividade regulatória em muitas funções celulares tais como secreção de hormônios, excitabilidade dos neurônios e dos músculos e de citoproteção na isquemia cardíaca e cerebral (ASHCROFT, 1988, TERZIC et al., 1995).

Os canais de potássio sensíveis ao ATP são formados por um complexo tetramérico das subunidades que forma o poro, estando cada subunidade associada a uma proteína reguladora pertencente a receptores da sulfoniluréia (SUR1, SUR2a ou SUR2b). Estes são definidos tendo por base a sua sensibilidade para o ATP intracelular que inibe a sua atividade. Na maioria das células excitáveis os canais de potássio sensíveis ao ATP estão fechados em condições fisiológicas e abertos quando a razão $[ATP]/[ADP]$ está diminuída. A dissociação da ATP causa a sua oclusão e conseqüente hiperpolarização da membrana (SOBEY, 2001).

Tem sido postulado que os canais de potássio estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sangüíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago. Entretanto, efeito canais de potássio sensíveis ao ATP na modulação dos eventos gastroprotetores não foram ainda completamente investigado.

Trabalhos recentes estudando os efeitos do diazóxido, ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, e da glibenclamida, bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, demonstraram que o diazóxido inibiu as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol enquanto que a glibenclamida aumentou as lesões gástricas induzidas por etanol (TOROUDI et al., 1999). O efeito lesivo direto da indometacina na mucosa gástrica de rato pode ser agravado pelo uso de bloqueadores de canais de potássio sensíveis ao ATP, como a glibenclamida. Entretanto, esse efeito pode ser inibido com o uso de ativadores desses canais, tais como o cromakalim e o diazóxido (AKAR et al., 1999). Peskar e colaboradores

demonstraram que a gastroproteção por vários agentes, incluindo etanol 20%, é inibido não somente pelo indometacina, mas também pela glibenclamida. Estes dados sugerem que o mecanismo da ação da PGs endógenos e exógenas envolve a ativação dos canais de potássio sensível ao ATP (PESKAR et al., 2002). Um outro grupo de pesquisadores mostrou que o diazóxido inibiu também a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos e a glibenclamida reverteu esta proteção (AKAR et al., 1999). Estes trabalhos sugerem que a regulação da abertura e fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP pode ser um mecanismo de defesa da mucosa gástrica a agressões externas. Até o momento, faltam estudos avaliando um possível papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP na proteção do LPS a lesão gástrica por AINEs.

Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs, bem como dos mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica como, por exemplo, a expressão aumentada COX-2 (MIYAKE et al., 2002; SOUZA et al., 2003), de NO sintase induzida (TAKEUCHI et al., 1999) e a abertura de canais de K sensíveis ao ATP (PESKAR et al., 2002), podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia da lesão gastrintestinal por AINEs.

2.0- OBJETIVOS:

- 2.1- Reproduzir o modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em ratos.
- 2.2- Verificar o possível efeito protetor do LPS na lesão gástrica e na infiltração de neutrófilos induzido por indometacina em ratos.
- 2.3- Verificar o efeito protetor do LPS na adesão leucocitária em vênulas mesentéricas pós-capilares de ratos tratados com indometacina.
- 2.4- Avaliar o efeito do LPS na concentração de glutathione induzida por indometacina.
- 2.5- Estudar o efeito do LPS associado ou não com a indometacina em contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico.
- 2.6- Investigar o papel da COX-2 na proteção do LPS à lesão gástrica e na infiltração de neutrófilos por indometacina em ratos.

- 2.7- Investigar o papel do óxido nítrico e da NOS induzida na proteção do LPS a gastropatia e a infiltração de neutrófilos por indometacina em ratos.

- 2.8- Verificar um possível efeito dos canais de K sensíveis ao ATP na proteção do LPS à lesão gástrica e na infiltração dos neutrófilos induzida por indometacina em ratos.

- 2.9- Investigar a participação da glibenclamida e do diazóxido no efeito protetor do LPS avaliando a infiltração leucocitária presente no sangue periférico de ratos tratados com indometacina.

- 2.10- Estudar o efeito de drogas que modulam os canais de K sensíveis ao ATP, como a glibenclamida e o diazóxido, na concentração de glutathione presente no efeito do LPS em modelo de gastropatia induzida por indometacina.

3.0- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 200 - 280 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Dezoito a vinte e quatro horas antes, em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados foram aprovados no Comitê de Ética em pesquisa animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.2 - APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.

- Alicate para deslocamento cervical
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AL200
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²)
- Capela de fluxo laminar Vico Biosafe Plus Classe II tipo A
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- ELISA ELX 800 - Biotek

- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergiestation T8.10 da Ika Labortechnik
- Lupa Cirúrgica Ramsor
- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000 μL
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Micrótomo Olympus
- Paquímetro Digital Mitotoyo
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)

3.3 – DROGAS.

- a) Acetato de Dexametasona (Merck), diluída em salina.
- b) Aminoguanidina (Sigma-Aldrich), diluída em salina.
- c) Diazóxido (Sigma-Aldrich), diluído em 1 M NaOH e 0,9% NaCl.
- d) Glibenclamida (Sigma-Aldrich), diluída em 4% de glicose e 0.01N de NaOH.
- e) Indometacina (Prodome Química e Farmacêutica Ltda), diluída em tampão Tris com pH de 8,0.
- f) Lipopolissacarídeo da *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4A (Sigma-Aldrich), diluído em 0,9% NaCl estéril.

g) L-NAME (Sigma-Aldrich), diluída em salina.

h) Rofecoxib (Pfiser), diluídos em 0,9% NaCl.

3.4- CORANTES.

- Corante de Turk

Ácido acético glacial (Synth) -----20,0 mL

Violeta de genciana -----2,0 mL

Água destilada -----1,0 L

- Corante rápido HEMA 3

- Eosina (Merck)

- Hematoxilina (Reagen)

3.5 - SOLUÇÕES.

- Solução salina:

Cloreto de sódio a 0,9% estéril.

- Tampão Tris:

Hidroximetil aminometano (Tris) ----- 6,1g.

Água destilada ----- 500 mL.

O pH do tampão foi acertado para 8,0.

- Tampão de ensaio para a enzima nitrato redutase:

Para 2,5 mL:

NADPH ----- 5 mg (500 μ L).

Nitrato redutase ----- 10 U (50 μ L).

KH_2PO_4 (pH 7,5) ----- 1 mL (0,5 M).

Água deionizada Mili-Q ----- 2,5mL.

Solução de Greiss:

- a) Solução 1:

H_3PO_4 ----- 25 mL.

Água deionizada Mili-Q ----- 50 mL.

- b) Solução 2:

Sulfanilamida ----- 0,5g.

H_3PO_4 5% ----- 25 mL.

- c) Solução 3:

Diamina-di-hidroclorido de naftaleno (NEED) ----- 0,05g.

Água deionizada Mili-Q ----- 25 mL.

Deixar as soluções estoques a 4 °C. Na hora do ensaio, misturar uma parte da solução 1, com uma parte da solução 2 e uma parte da solução 3 e uma parte de água destilada.

- Tampão fosfato de potássio:

Solução A ----- 988 mL.

Solução B ----- 12 mL.

Solução A:

KH_2PO_4 (Synth) ----- 6,8 g.

Água destilada ----- 1 L.

Solução B:

K_2HPO_4 (Synth) ----- 8,7 g.

Água destilada ----- 1 L.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)

HTAB (Sigma) ----- 5 g.

Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) ----- 1 mL.

Água destilada ----- 29 mL.

- Solução de o-dianisidina (DDI)

O-dianisidina (Sigma) ----- 16,7 mg.

Tampão fosfato de potássio ----- 10 mL.

H₂O₂ -----50 µL.

Água destilada -----90 mL.

- EDTA 0,2 M

EDTA -----1,737 g.

H₂O destilada ----- 23,3 mL.

- EDTA 0,02 M

Solução de EDTA 0,2 M ----- 10 mL.

H₂O destilada ----- 100 mL.

- Tris 0,4 M pH 8,9

Tris ----- 4,84 g.

EDTA 0,2 M ----- 10 mL.

H₂O destilada ----- 100 mL.

- DTNB 0,01 M

DTNB ----- 13,2 mg.

Metanol ----- 3,33 mL.

3.6- EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - CURVA DOSE RESPOSTA.

Os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS em várias doses (30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) diluída em salina. Após 6 horas, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina (20 mg/Kg) diluída em tampão Tris. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Tris). Três horas após a injeção de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi feita depois do órgão ser estirado. A mensuração das erosões lineares foi realizada utilizando-se um paquímetro (figura 2) e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O INDICE DE LESÃO (I.L.) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI et al., 1994). Após a medida das lesões, dois fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados. Um fragmento foi pesado e posteriormente congelado à -70° até a realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO), seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al, 1982.



Figura 2- Paquímetro digital utilizado para a medida das extensões das lesões.

3.7- EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS - CURVA TEMPO RESPOSTA.

Os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS (300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou salina. Após 30 minutos, 6, 24 e 48 horas a lesão gástrica foi induzida pela administração por gavagem, de indometacina na dose 20 mg/Kg, diluída em tampão Tris. O grupo controle receberá apenas o veículo (Tris). Decorridas 3 horas após a administração de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura. A mensuração da lesão da mucosa gástrica foi realizada conforme descrição na seção anterior. Após a medida das lesões, um fragmento do corpo gástrico de cada animal foi retirado, pesado e posteriormente congelado à -70° para realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO), seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al., 1982.

3.8 – LEUCOGRAMA.

As contagens leucocitárias total e diferencial foram feitas de acordo com método de Souza e Ferreira (1985). Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina. Três horas depois da administração, os animais foram tratados por via oral com Tris ou indometacina (20 mg/Kg). Após três horas, os animais tiveram o sangue colhido através de uma punção cardíaca. Do sangue colhido, foi obtido um esfregaço em lâmina para a realização da contagem diferencial. As lâminas foram coradas com corante rápido HEMA 3 e a contagem foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100x). Foram contadas 200 células e calculadas as percentagens de polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN). O número total de PMN e MN será calculado multiplicando-se as percentagens pelo número total de leucócitos, obtidas na contagem totais.

Para a contagem total, 20 µL de sangue foram diluídos em 380 µL de Turk (diluição 1:20) e o número de leucócitos foi contado em câmara de Neubauer.

3.9 – DETERMINAÇÃO DO ROLLING E A ADESÃO DE NEUTRÓFILOS NA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA POR MICROSCOPIA INTRAVITAL.

O rolling e a adesão dos leucócitos foram realizados como descrito previamente por SECCO et al. (2004). Com o objetivo de verificar se o LPS interfere na adesão e no rolling leucocitário induzido por indometacina, à técnica

de microscopia intravital foi realizada nas vênulas mesentéricas pós-capilares de ratos pré-tratados por via endovenosa com LPS na dose 300 µg/Kg diluída em salina. Após 6 horas, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina (20 mg/Kg) diluída em tampão Tris. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Tris). Inicialmente, animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg). O tecido mesentérico foi exposto para a observação microscópica *in situ*. Este processo foi realizado através de uma incisão longitudinal da pele e do músculo abdominal no lado direito do corpo seguido pela exposição do mesentério. Os movimentos respiratórios dos animais não foram afetados durante a preparação, e as características microcirculatórias permaneceram basicamente estáveis durante todo o curso da experiência. Os animais foram mantidos em uma placa especial com temperatura controlada em torno de 37 °C, com uma plataforma transparente trans-iluminada onde o tecido a ser analisado foi colocado. As veias selecionadas para o estudo continham vênulas de terceira ordem, definido de acordo com sua posição dentro da rede microvascular. Estas veias corresponderam as vênulas pós-capilares, com um diâmetro de 10-18 µm. A interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio vascular foi estudada em um segmento da veia. O rolling dos leucócitos foi definido como as células do sangue (células brancas) que se moveram em uma velocidade menor do que os eritrócitos na mesma vênula mesentérica. O número de leucócitos rolados foi determinado no intervalo de 10 minutos (FORTES et al., 1991). O leucócito foi considerado como aderido ao endotélio vascular se permanecesse estacionado por um período de 30 segundos (GRANGER et al.,

1989). As células aderidas foram expressas como o número de células por 10 μm de comprimento na vênula mesentérica. As células foram contadas na imagem gravada usando cinco diferentes campos para cada animal. Os resultados foram expresso como média \pm E.P.M para cada animal.

3.10 - DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SUFIDRILAS NO ESTÔMAGO.

Inicialmente, os animais receberam por via endovenosa LPS (300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou salina. Decorridos 3 horas, a lesão gástrica foi induzida pela administração por via oral de Tris ou indometacina (20 mg/Kg). Decorridas 3 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados e fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados, pesados para determinação dos grupos sulfidrilas, seguindo a técnica descrita por Sedlak & Lindsay (SEDLAK J & LINDSAY RH, 1968). Inicialmente foi preparado um homogenato 10% (100 mg do tecido de estômago/ ml) em EDTA 0,02M. Alíquotas (400 μl) de tecido homogeneizado foram misturados a 320 μl de água destilada, 80 μl de ácido tricloacético 50% e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Depois de centrifugado, 400 μl do sobrenadante foram misturados a 800 μl de tampão Tris 0.4 M, pH 8.9. Por fim, 20 μl de 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) 0,01M (DTNB) foi adicionado e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de GSH/g foi determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona redutase, processada de maneira semelhante.

3.11 - PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Os animais receberam, inicialmente, por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina. Após 5 horas, os animais foram tratados por via intra-peritoneal com salina, L-NAME (inibidor não específico NOS; 20 mg/Kg) ou aminoguanidina (inibidor relativamente específico da NOSi) na dose de 100 mg/Kg (dose única). Um outro grupo experimental, 30 minutos antes da administração de LPS (300 µg/Kg), foi tratado inicialmente por via intra-peritoneal com aminoguanidina na dose de 50 mg/Kg (duas doses). Após 5 horas, os animais foram novamente tratados por via intra-peritoneal com aminoguanidina na mesma dose. Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg diluída em tampão Tris. Decorridas 3 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados e a lesão gástrica foi avaliada utilizando o I.L., conforme descrito acima. Após a medida das lesões, fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados, pesados e posteriormente congelado à -70° até a realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO), seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al., 1982.

3.12 - PAPEL DA COX-2 NO EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Após 18- 24 horas de jejum, os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS (300 µg/Kg) ou salina. Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina ou rofecoxib (inibidor seletivo da COX-2) na dose de 20 mg/Kg (dose única). Outro grupo experimental, 30 minutos antes da administração de LPS (300 µg/Kg), foi tratado inicialmente por gavagem, com rofecoxib na dose de 10 mg/Kg (duas doses). Após 5 horas, a mesma dose de rofecoxib foi novamente administrada nos animais. Transcorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg diluída em tampão Tris. Decorridas 3 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados e a lesão gástrica foi avaliada utilizando o I.L., conforme descrito acima. Após a medida das lesões, fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados, pesados e congelados à -70° até a realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO), seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al., 1982.

3.13 - EFEITO DA DEXAMETASONA NO PAPEL PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Após o período de jejum, os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS (300 µg/Kg) ou salina. Após 5 horas, os animais foram tratados por via intra-peritoneal com salina ou dexametasona na dose de 2 mg/Kg (dose única). Trinta minutos antes da administração de LPS (300 µg/Kg), outro grupo de animais foi tratado inicialmente por gavagem com dexametasona na dose de 1

mg/Kg (duas doses). Após 5 horas, a mesma dose de dexametasona foi novamente administrada nos animais. Transcorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg diluída em tampão Tris. Decorridas 3 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados e a lesão gástrica foi avaliada utilizando o I.L., conforme descrito acima. Após a medida das lesões, fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados, pesados e congelados à -70° até a realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO), seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al., 1982.

3.14 - PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NA PROTEÇÃO DO LPS A LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina. Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina, glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP; 0.3, 1, 3 mg/Kg, por gavagem), diazóxido (ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP; 3 mg/Kg, por via intra-peritoneal) ou diazóxido (3 mg/Kg, por via intra-peritoneal) + glibenclamida (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 30 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg diluída em tampão Tris. Decorridas 3 horas da administração de indometacina, os animais tiveram o sangue colhido através de uma punção cardíaca para determinação do leucograma seguindo a técnica citada anteriormente e descrita

por Souza e Ferreira (1985) (SOUZA & FERREIRA, 1985). Posteriormente, os animais foram sacrificados e a lesão gástrica foi avaliada utilizando o I.L., conforme descrito acima. Após a medida das lesões, fragmentos do corpo gástrico de cada animal foram retirados, pesados e posteriormente congelado à -70° até a realização do ensaio da mieloperoxidase (MPO) seguindo a técnica descrita por BRADLEY et al., 1982. Outro fragmento do corpo gástrico de cada animal foi retirado, pesado e posteriormente congelado à -70° até a determinação dos níveis de glutathione, seguindo a técnica citada anteriormente e descrita por Sedlak & Lindsay (SEDLAK J & LINDSAY RH, 1968).

3.15 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NO ESTÔMAGO.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. Para tanto, 50 a 100 mg de tecido gástrico, depois de pesados, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em um Politron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por BRADLEY et al., utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de

converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como Atividade de MPO/mg de tecido (BRADLEY et al., 1982).

3.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram expresso ou como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana \pm desvio padrão (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.0- RESULTADOS

4.1- EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Na figura 3, observa-se que não houve lesão da mucosa gástrica dos ratos tratados somente com LPS (painel B) quando comparado como controle (painel A). Por outro lado, observam-se várias lesões hemorrágicas em toda a mucosa no grupo tratado com indometacina (20 mg/Kg; painel C). O painel D mostra que o tratamento com LPS protegeu a mucosa gástrica de lesões induzidas por indometacina.

Os grupos pré-tratados inicialmente com LPS nas três doses testadas (30, 100, 300 µg/Kg) reduziram significativamente ($p < 0,001$) a lesão gástrica (Figura 4, painel A) e o aumento da atividade de MPO (Figura 4, painel B) induzida por indometacina, de maneira dose dependente, com o efeito máximo na dose de 300 µg/Kg (figura 4; painel A).

Na avaliação da curva tempo-resposta do efeito protetor do LPS (figura 5) observa-se uma significativa redução da lesão gástrica (painel A) e do aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina pelo tratamento com LPS (300 µg/Kg) com efeito máximo no tempo de seis horas. Observa-se ainda que esse efeito protetor persiste por pelo menos 48 horas, após uma única injeção de LPS.

O efeito protetor do LPS na dose de 300 µg/Kg causou alterações significativas na contagem leucocitária total e diferencial. O pré-tratamento com

LPS aumentou de forma significativa ($p < 0.05$) as contagens dos neutrófilos no sangue periférico durante a gastropatia induzida pela indometacina (tabela 1).

A determinação dos grupos sulfidrilas na mucosa de ratos mostrou que a indometacina diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o nível de glutathione quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o pré-tratamento com LPS na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ fez com que os níveis de glutathione retornasse a valores semelhantes aos animais do grupo controle (figura 6).

Na figura 7 observa-se o efeito do LPS na adesão de leucócitos induzida por indometacina em ratos. Para isso foi realizada uma microscopia intravital nas vênulas mesentéricas pós-capilares de ratos pré-tratados por via endovenosa com LPS na dose 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. O tratamento com LPS na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ diminuiu de forma significativa ($P < 0,001$) a adesão leucocitária nas vênulas mesentéricas pós-capilares de ratos tratados com indometacina. Por outro lado, na figura 8, o LPS foi capaz de reverter o efeito da indometacina. Na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, O LPS aumentou significativamente o rolling dos leucócitos nas vênulas mesentéricas pós-capilares dos ratos tratados com indometacina quando comparado com o grupo controle.

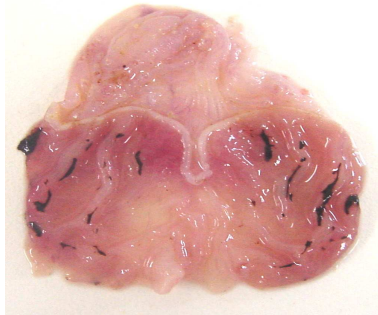
A**B****C****D**

Figura 3- Efeito do tratamento do LPS de *E. coli* na lesão gástrica induzida por indometacina em ratos. Aspecto macroscópico do estômago de ratos após LPS na dose de 300 µg/Kg (painel B), indometacina na dose de 20 mg/Kg (painel C) ou LPS + indometacina nas mesmas doses citadas anteriormente(painel D) em comparação ao padrão normal da mucosa gástrica do rato controle (painel A).

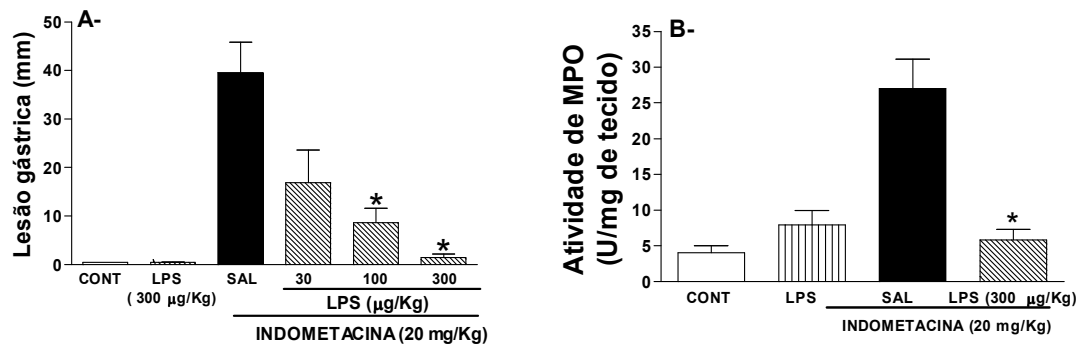


Figura 4- Efeito do tratamento do LPS na lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos – Dose resposta. Os ratos foram tratados com salina (SAL) ou LPS na dose de 30,100 e 300 µg/Kg. Seis horas depois, indometacina (20 mg/Kg) foi administrado. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O índice de lesão gástrica (painel A) e a atividade de mieloperoxidase (painel B) foram avaliados depois de três horas. A administração de LPS inibiu de forma dose dependente a lesão gástrica (painel A) e o aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos, com efeito, máximo na dose de 300 µg/Kg. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com Indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

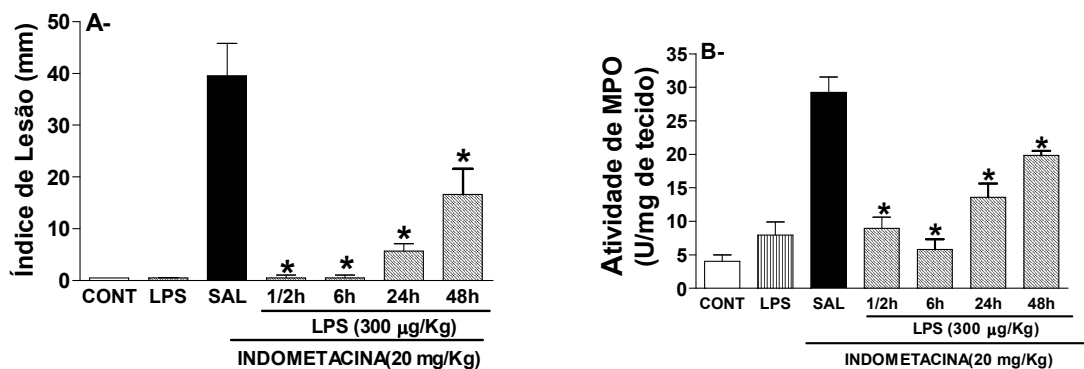


Figura 5- Efeito do tratamento do LPS na lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos – Tempo resposta. Os ratos foram tratados com salina (SAL) ou LPS na dose de 300 µg/Kg. Ao final de 1/2, 6, 24, e 48 horas, indometacina (20 mg/Kg) foi administrado. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O índice de lesão gástrica (painel A) e a atividade de mieloperoxidase (painel B) foram avaliados depois de três horas. A administração de LPS inibiu a lesão gástrica (painel A) e o aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos, com efeito, máximo no tempo de seis horas. LPS causou um significativo efeito protetor que se persistiu por 48 horas. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 1- Efeito protetor do LPS de *E. coli* na contagem de leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico de ratos tratados com indometacina.

	<i>Leucócitos (cell/mm³)</i>	<i>Neutrófilos(cell/mm³)</i>
Controle	9425,0 ± 269	1567,0 ± 33
LPS	4913,0 ± 321*	4221,0 ± 49*
indometacina	7679,0 ± 211	1432,0 ± 184
LPS + indometacina	13900,0 ± 890**	9480,0 ± 183**

* p<0.05 quando comparado com o grupo controle.

** p<0.05 quando comparado com o grupo indometacina.

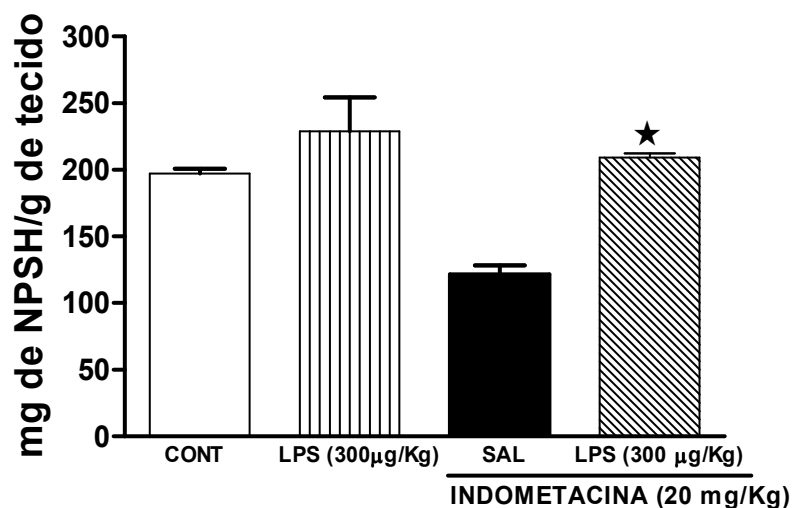


Figura 6- Determinação dos níveis de glutathiona presentes na mucosa de ratos tratados com LPS. Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 μg/Kg) ou salina. Após 6 horas, os animais foram tratados com Tris ou indometacina (20 mg/Kg), por via oral. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. LPS foi capaz de reverter o efeito da indometacina aumentando de forma significativa os valores de NPSH na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman - Keuls.

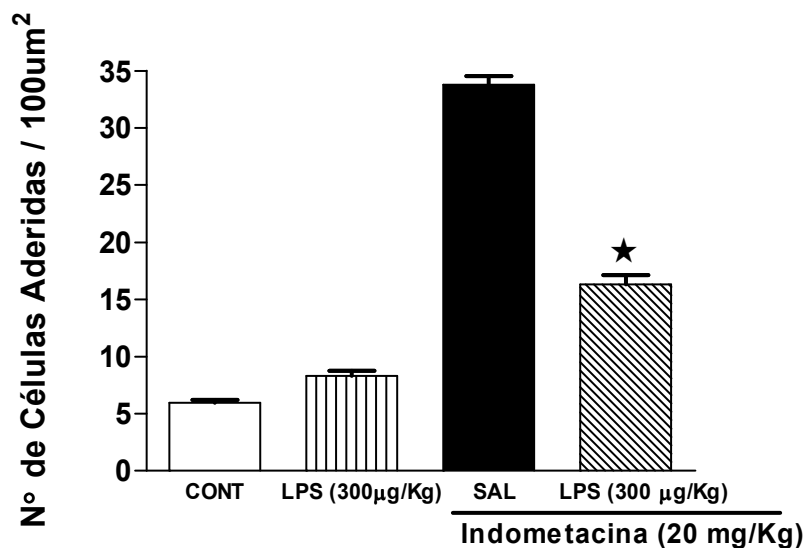


Figura 7- Efeito do LPS de *E. coli* na diminuição da adesão leucocitária induzida por indometacina. Os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS na dose 300 μg/Kg diluída em salina. Após 6 horas, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina (20 mg/Kg) diluída em tampão Tris. O grupo controle (CONT) recebeu apenas o veículo (Tris). Uma hora depois, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg) e o tecido mesentérico foi exposto e examinado por microscopia intravital. O tratamento com LPS na dose de 300 μg/Kg diminui a adesão leucocitária nas vênulas mesentéricas pós-capilares induzida por indometacina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman - Keuls.

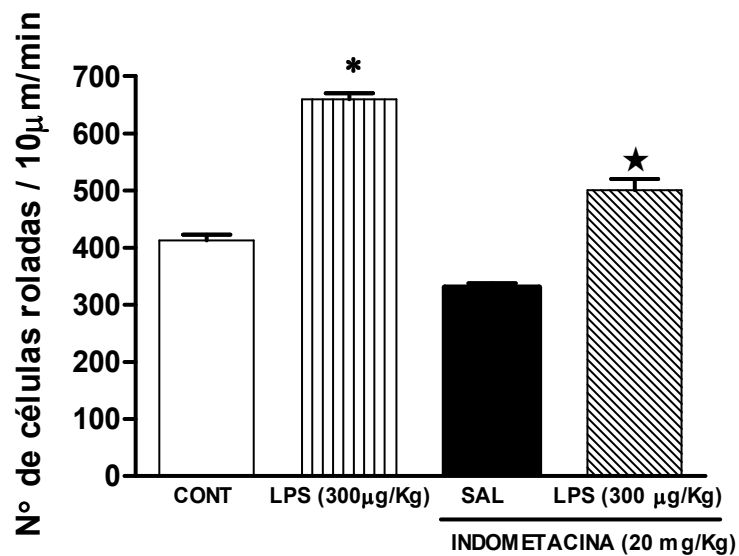


Figura 8- Efeito do LPS de *E. coli* no aumento do rolling dos leucócitos induzido por indometacina. Os animais foram pré-tratados por via endovenosa com LPS na dose 300 µg/Kg diluída em salina. Após 6 horas, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina (20 mg/Kg) diluída em tampão Tris. O grupo controle (CONT) recebeu apenas o veículo (Tris). Uma hora depois, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg) e o tecido mesentérico foi exposto e examinado por microscopia intravital. O tratamento com LPS na dose de 300 µg/Kg aumentou o rolling leucocitário nas vênulas mesentéricas pós-capilares induzida por indometacina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman - Keuls.

4.2- MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO PROTETOR DO LPS NA LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA EM RATOS.

Na figura 9, demonstra-se que o L-NAME não alterou a proteção do LPS na gastropatia por indometacina (painel A). Por outro lado, o L-NAME aumentou de forma significativa a infiltração de neutrófilos, medida pela atividade de MPO (painel B), na mucosa gástrica quando administrado na dose de 20 mg/Kg (painel B).

A figura 10 mostrou que o tratamento com aminoguanidina na dose única de 100 mg/Kg e nas duas doses testadas de 50 mg/Kg não foi capaz de reverter o efeito protetor do LPS nem lesão gástrica (painel A) e nem no aumento da atividade de MPO (painel B) induzidas por indometacina em ratos.

Na figura 11 observa-se que o tratamento com rofecoxib na dose de 20 mg/Kg (dose única) ou na dose de 10 mg/Kg (duas doses) não alterou a proteção do LPS na gastropatia por indometacina (painel A). O mesmo resultado foi observado quando avaliada a atividade de MPO, pois o pré-tratamento com rofecoxib nas doses testadas não foram capazes de alterar a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica tratada com LPS mais indometacina (painel B).

O pré-tratamento com dexametasona (figura 12) não reverteu o efeito protetor do LPS nem na lesão gástrica (painel A) e nem na atividade de MPO (painel B) na dose de 2 mg/Kg. A mesma resposta foi obtida quando o tratamento com dexametasona foi feito usando duas doses de 1 mg/Kg, uma 30 minutos antes e outra 5 horas depois da administração do LPS (300 µg/Kg).

Na figura 13 observa-se que a glibenclamida nas doses testadas de 0,1,1 ou 3 mg/Kg revertem ($p < 0,001$) o efeito protetor do LPS na gastropatia induzida por indometacina, com efeito máximo na dose de 1 mg/Kg (painel A). Além disso, no painel B nota-se um aumento na infiltração de neutrófilos, medido pela atividade de MPO, no estômago de ratos tratados com glibenclamida nas doses testadas. Nos animais pré-tratados com diazóxido na dose de 3 mg/Kg (figura 14) não se observam mudanças no efeito protetor do LPS, nem na lesão gástrica (painel A) e nem na atividade de MPO (painel B).

Ademais, o efeito protetor do LPS na gastropatia induzida por indometacina também foi mantido no grupo de animais tratados com glibenclamida mais diazóxido (figura 15). Glibenclamida mais diazóxido não reverteu o índice de lesão gástrica (Painel A) e nem aumentou a infiltração neutrofílica (Painel B) na mucosa de ratos tratados com LPS, diferente do observado em ratos tratados somente com glibenclamida.

O grupo de animais pré-tratados com glibenclamida diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o número de leucócitos totais e neutrófilos quando comparado com o grupo LPS mais indometacina. Por outro lado, quando os animais foram pré-tratados com glibenclamida mais diazóxido ocorreu um aumento na contagem leucocitária total e diferencial, fazendo com que os níveis de leucócitos e neutrófilos retornassem a níveis semelhantes ao do grupo tratado com LPS mais indometacina (tabela 2).

Na figura 16 a glibenclamida reverteu o efeito do LPS, de forma significativa, fazendo com o que os níveis de glutathiona fossem semelhantes ao do

grupo de animais tratados com indometacina. No grupo de animais tratados com glibenclamida mais diazóxido os valores de glutathione aumentaram retornando a valores semelhantes ao do grupo tratado com LPS mais indometacina.

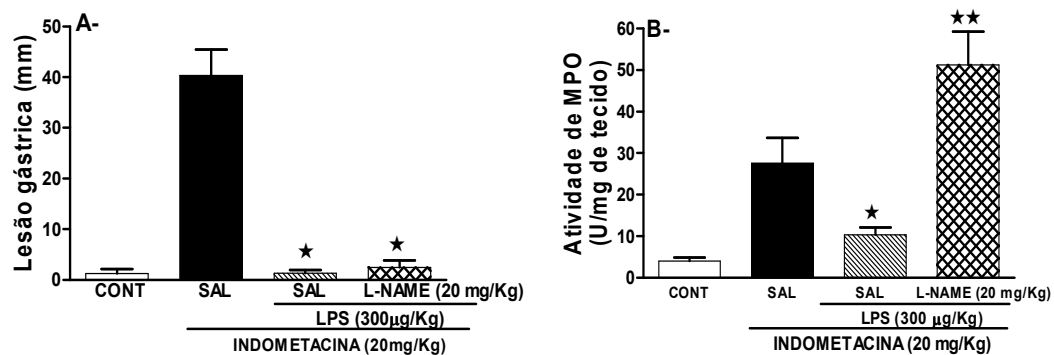


Figura 9- Efeito do tratamento com L-NAME na proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam LPS (300 μg/Kg) ou salina (SAL) por via endovenosa. Após 5 horas, os animais foram tratados por via intra-peritoneal com salina ou L-NAME (20 mg/Kg). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração de indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com L-NAME não foi capaz de alterar a proteção do LPS na gastropatia por indometacina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) p<0,05, quando comparado o grupo tratado com Indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

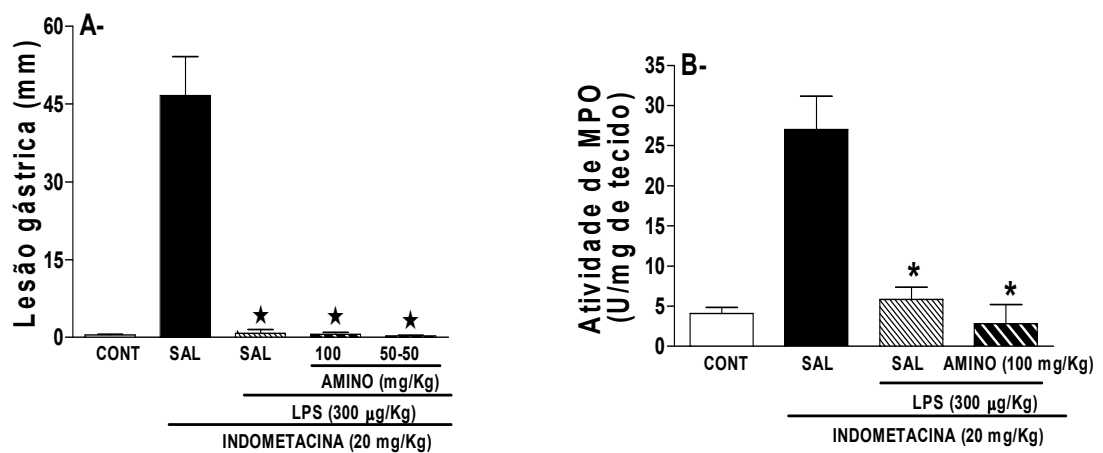


Figura 10- Efeito do tratamento com aminoguanidina (AMINO) na proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam, inicialmente, por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via intra-peritoneal com SAL ou AMINO (100 mg/Kg). Um outro grupo experimental foi tratado inicialmente com AMINO na dose de 50 mg/Kg, 30 minutos antes e 5 horas após a administração de LPS 300µg/Kg, via intra-peritoneal. Uma hora depois, os animais receberam indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com AMINO não foi capaz de alterar a proteção do LPS na gastropatia por indometacina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

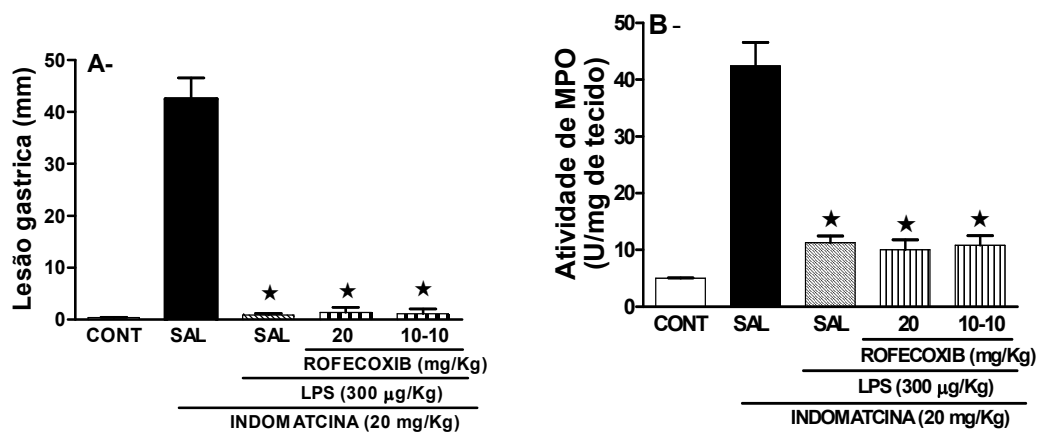


Figura 11- Efeito do tratamento com rofecoxib na proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam, inicialmente, por via endovenosa LPS (300 μ g/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com SAL ou rofecoxib (20 mg/Kg; 1X). Um outro grupo experimental foi tratado inicialmente com rofecoxib na dose de 10 mg/Kg (2X), 30 minutos antes e 5 horas após a administração de LPS 300 μ g/Kg, via oral. Uma hora depois, os animais receberam indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com rofecoxib não foi capaz de alterar a proteção do LPS na gastropatia por indometacina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

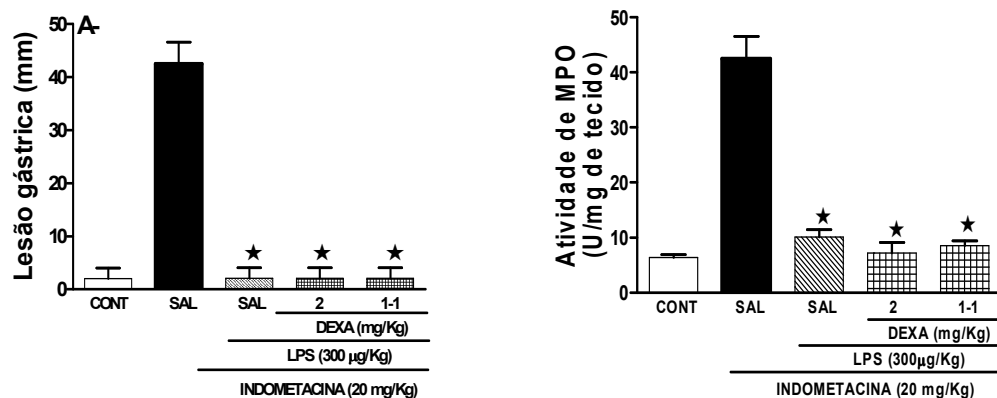


Figura 12- Efeito do tratamento com dexametasona (DEXA) na proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) e aumento da atividade de mieloperoxidase (painel B) induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam, inicialmente, por via endovenosa LPS (300 μ g/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via intra-peritoneal com SAL ou DEXA (2 mg/Kg; 1X). Um outro grupo experimental foi tratado inicialmente com dexametasona na dose de 1 mg/Kg (2X), 30 minutos antes e 5 horas após a administração de LPS 300 μ g/Kg, via intra-peritoneal. Uma hora depois, os animais receberam indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com dexametasona não alterou a proteção do LPS na gastropatia por indometacina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

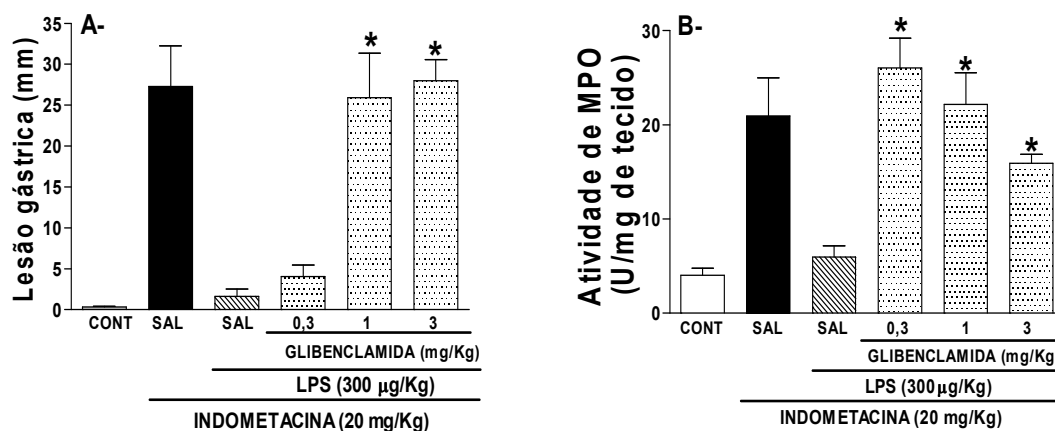


Figura 13- Efeito do tratamento com glibenclamida na proteção do LPS a lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina, glibenclamida (0.3, 1, 3 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com glibenclamida reverteu tanto à proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) induzida por indometacina como também a atividade de MPO (painel B). Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com Indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

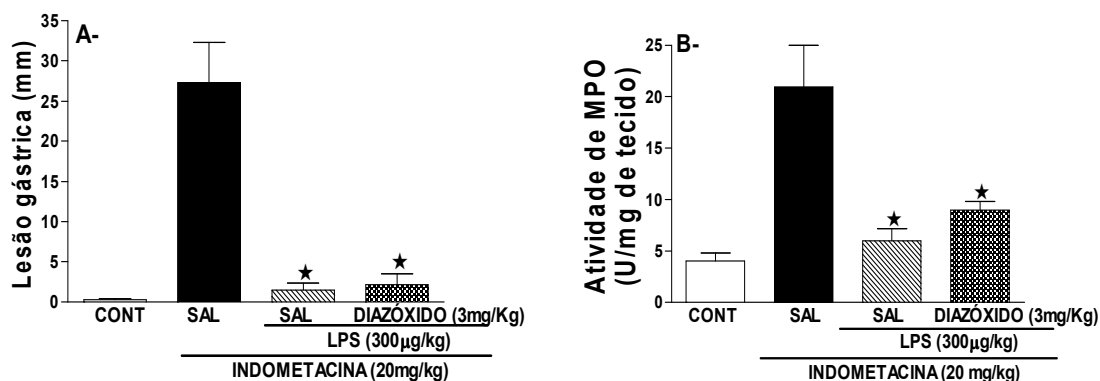


Figura 14- Efeito do tratamento com diazóxido na proteção do LPS a lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina, diazóxido (3 mg/Kg, via intra-peritoneal). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com diazóxido não reverteu à proteção do LPS à lesão gástrica (painel A) induzida por indometacina como também a atividade de MPO (painel B). Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com Indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman- Keuls.

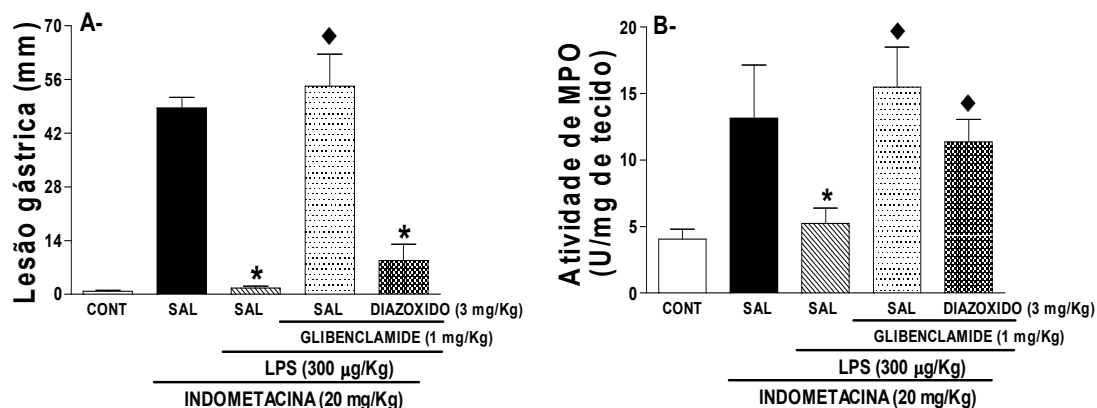


Figura 15- Efeito do tratamento com diazóxido no efeito da glibenclamida na proteção do LPS à lesão gástrica e aumento da atividade de mieloperoxidase induzidas por indometacina em ratos. Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina, diazóxido (3 mg/Kg, por via intra-peritoneal) + glibenclamida (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 30 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de indometacina na dose de 20 mg/Kg. O grupo controle (CONT) foi tratado com salina ou tampão Tris. O tratamento com diazóxido reverteu o efeito da glibenclamida na perda da proteção do LPS (painel A) e na atividade de MPO (painel B) induzida por indometacina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman - Keuls.

Tabela 2 – Efeito dos canais de potássio sensíveis a ATP na contagem de leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico de ratos no efeito protetor do LPS na lesão gástrica induzida por indometacina.

	<i>Leucócitos (cell/mm³)</i>	<i>Neutrófilos (cell/mm³)</i>
Indometacina	7679,0 ± 211	1432,0 ± 184
LPS + indometacina	13900,0 ± 890	9480,0 ± 183
LPS + indometacina + glibenclamida	6120,0 ± 422 [#]	4896,0 ± 114 [#]
LPS +indometacina+ glibenclamida + diazóxido	8080,0 ± 264 ^{##}	5478,0 ± 70 ^{##}

[#] p<0.01 quando comparado com o grupo LPS + indometacina.

^{##} p<0.05 quando comparado com o grupo LPS + indometacina + glibenclamida.

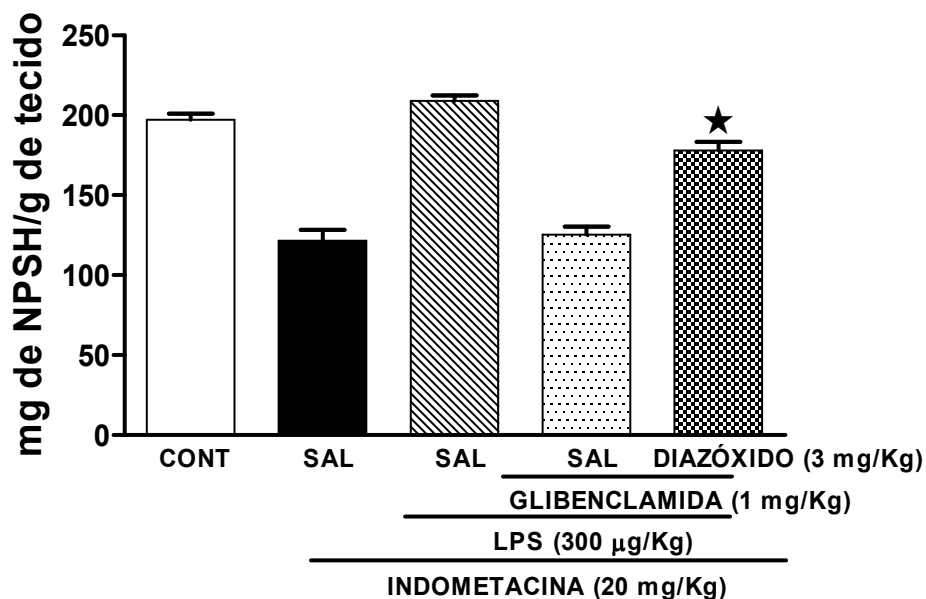


Figura 16- Determinação dos níveis de glutathiona presentes na mucosa de ratos tratados glibenclamida e diazóxido mais glibenclamida. Os animais receberam por via endovenosa LPS (300 µg/Kg) ou salina (SAL). Após 5 horas, os animais foram tratados por via oral com salina, glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP; 1 mg/Kg, por gavagem) ou diazóxido (ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP; 3 mg/Kg, por via intra-peritoneal) + glibenclamida (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida como já descrito anteriormente. Glibenclamida foi capaz de manter o efeito da indometacina, ou seja, os baixos níveis de grupos sulfidrilas foram semelhantes ao do grupo de animais tratados com indometacina. No grupo de animais tratados com glibenclamida + diazóxido os valores de glutathiona aumentaram retornando a valores semelhantes ao do grupo controle. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo tratado com indometacina. Anova, seguido pelo teste de Newman - Keuls.

5.0- DISCUSSÃO

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo. A toxicidade gastrointestinal constitui a maior limitação para o uso dos AINEs. Atualmente, sabe-se que cerca de 10 a 20% dos pacientes em uso de AINEs apresentam sintomas dispépticos (WOLFE et al., 1999).

O efeito do LPS na defesa da mucosa gástrica não está definido. Por um lado à administração aguda de LPS levaria a lesão na mucosa do trato gastrointestinal (BOUGHTON-SMITH et al., 1993), por outro a administração de altas doses de maneira crônica protegeria a mucosa gástrica a lesão por etanol (KONTUREK et al., 1998). A administração de LPS em altas doses é capaz de induzir a expressão de COX-2 e de NOSi na mucosa gástrica, e assim aumentar a síntese de NO e PGs, que são importantes mediadores da defesa da mucosa. Recentemente, Peskar e colaboradores demonstraram a participação dos canais KATP em vários modelos da proteção gástrica, como 16, 16- prostaglandina dimethyl- E2, etanol 20%, salicilato de sódio (PESKAR et al., 2002). Entretanto, o papel dos canais de KATP e do LPS na proteção gástrica a lesões induzidas por indometacina não este completamente elucidado. Usando como ferramenta farmacológica, a glibenclamida (um bloqueador de canais de KATP) ou o diazóxido (uma droga ativadora de canais de KATP), nós demonstramos que o efeito protetor dos LPS na lesão gástrica induzida por indometacina foi mediado, em parte, pela abertura dos canais de KATP.

Neste estudo nós investigamos o efeito da administração do LPS de *E. coli* na defesa da mucosa gástrica, usando um modelo clássico de inflamação gástrica, a gastropatia induzida por indometacina. Em 1993, Wallace e colaboradores desenvolveram os primeiros trabalhos demonstrando o papel dos neutrófilos na gênese da lesão gastrintestinal por AINEs (WALLACE et al., 1993). Eles mostraram que a indometacina, um dos antiinflamatórios não esteroidais mais potentes, foi capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio na microcirculação gástrica e mesentérica em ratos e que a neutropenia induzida por metotrexate ou pelo soro anti-neutrofílico inibiram a lesão gástrica induzida por AINEs (WALLACE et al., 1990). Nossos resultados mostraram que o tratamento com LPS diminuiu de forma significativa a lesão gástrica e a atividade de MPO induzida pela indometacina. A administração oral de indometacina (20 mg/kg) em ratos resultou na formação de erosões hemorrágicas no estômago (WALLACE et al. 1990, SOUZA et al., 2003). Uma única dose de LPS foi capaz de abolir completamente a lesão gástrica, com efeito máximo na dose de 300 µg/kg e no tempo de seis horas. Entretanto, esse efeito protetor do LPS foi persistente por um período de pelo menos 48 horas. Nossos resultados estão no acordo outros trabalhos publicados anteriormente. Em 1998, Konturek e colaboradores demonstraram que o LPS administrado por via intraperitoneal inibiu a secreção de pepsina e ácido gástrico e reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol (KONTUREK et al., 1998). Recentemente, Calatayud e colaboradores demonstraram que a administração dos LPS preservou a perfusão sanguínea e protegeu a mucosa

gástrica de lesões induzidas por indometacina (CALATAYUD et al., 2003).

Nosso estudo demonstrou que o LPS diminuiu a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, mensurada pela atividade de MPO, induzida por indometacina. As Bactérias gram-negativas ou endotoxinas circulantes podem suprimir alguns componentes da resposta inflamatória incluindo a migração neutrofílica (ROSENBAUM et al., 1983, CUNHA et al, 1989, THOMAZZI et al., 1995). A compreensão da inibição da migração de neutrófilos induzida por LPS não esta completamente elucidada. Muitos mecanismos, tais como a leucopenia (MORRISON & ULEVITCH, 1978), a liberação continua de fatores quimiotáticos na circulação (CUNHA et al, 1989, CUNHA et al., 1992, WAGNER et al., 2002), um aumento na produção de NO pela iNOS (TAVARES-MURTA et al., 2001), a ativação do sistema de coagulação (PEARSON et al., 1995) o seqüestramento vascular dos neutrófilos (WAGNER et al., 2002) e o aumento da adesão leucocitária (WALLACE, 1993) podem participar deste processo. Nossos resultados demonstraram que o LPS administrado por via endovenosa não induziu leucopenia. Como pode ser observado na tabela 1, o LPS aumentou as contagens dos neutrófilos no sangue periférico na gastropatia induzida pela indometacina. Uma outra possibilidade é que a endotoxina poderia está induzindo um seqüestramento de neutrófilos no leito vascular. Assim, diminuindo a migração de neutrófilos para mucosa gástrica e aumentando o número de neutrófilos no sangue periférico, como observado na figura 4 e na tabela 1.

Dessa forma, nossos resultados sugeriram que o efeito protetor do LPS contra lesões gástricas induzidas por indometacina é em parte dependente da

inibição da infiltração de neutrófilos para o sítio inflamado. A adesão do leucócito à célula endotelial, uma das principais etapas da migração de neutrófilo, parece ser modulado por uma variedade de proteínas de adesão expressada na superfície dos leucócitos e das células endoteliais (DAVENPECK et al., 1997). Alguns estudos mostraram que estas moléculas da adesão são responsáveis pela diminuição da velocidade do rolling do leucócito e pelo aumento na adesão e na transmigração dos leucócitos. Na lesão gástrica por indometacina, já foi demonstrado que a adesão do leucócito à célula endotelial foi reduzida significativamente pelo tratamento com os anticorpos contra CD11b/CD18 ou E-selectina, mas não pelo anticorpo contra P-selectina, sugerindo que as proteínas de adesão do leucócito e das células endotelial (E-selectina) contribuem para um aumento dos leucócitos neste modelo de lesão gástrica (WALLACE et al., 1993).

No nosso trabalho, a administração de indometacina resultou num aumento no número de leucócitos aderidos e transmigrao e por uma redução na velocidade do rolling. Nossos resultados evidenciaram que o LPS foi capaz de reverter este efeito da indometacina, pois diminui de forma significativa a adesão leucocitária e aumentou o rolling dos leucócitos nas vênulas mesentéricas pós-capilares (Figuras 7 e 8). Dessa forma, o LPS protegeria a mucosa de lesões induzidas por indometacina por um mecanismo dependente da diminuição da infiltração de leucócitos por uma diminuição na adesão e aumento no rolling.

A adesão do neutrófilo ao endotélio vascular e a liberação subsequente de radicais livres de oxigênio e de enzimas proteolíticas foi implicado como um evento crítico na patogênese da ulceração gastrointestinal induzido por AINEs.

(WALLACE, 1993). As espécies ativas do oxigênio causam os danos na mucosa gástrica *in vivo*. Entretanto, não se sabe se estas espécies são diretamente citotóxicas para células gástricas. Sakuma e colaboradores mostraram que o peróxido de hidrogênio está envolvido nas lesões gástricas na mucosa de ratos. Visto que, enquanto a superóxido dismutase estimula a síntese do prostaglandina E2 que protege a mucosa, o peróxido de hidrogênio inibe essa proteção fazendo com que a mucosa fique susceptível ao aparecimento de lesões (SAKUMA et al., 1992). A glutatona é uma sulfidrilas endógena importante como “scavengers” dos radicais livres. Assim, na presença de radicais livres ocorre o seu consumo. Por isso o papel da glutatona (GSH) na proteção gástrica pelo LPS lesão gástrica induzida por indometacina foi investigado. A administração de indometacina em nossos experimentos diminuiu os níveis dos GSH na mucosa gástrica, provavelmente devido ao consumo destes pelos radicais livres presentes. O LPS quando administrado sozinho foi capaz de aumentar a concentração de glutatona na mucosa gástrica e quando administrado antes da indometacina fez com que os níveis de GSH retornassem ao nível do controle (Figura 6). Este efeito pode ter ocorrido devido a um menor consumo de GSH por uma inibição da liberação de radicais livres, devido a uma menor infiltração de neutrófilos para a mucosa gástrica, ou por um aumento da síntese de novo da GSH. De acordo com os nossos resultados está o trabalho de Ueshima e colaboradores. Eles concluíram que a administração prévia de cisteamina e glutatona aumentou os níveis de GSH e inibiram as lesões gástricas induzidas por indometacina (UESHIMA et al., 1992).

Apesar de se acreditar que as PGs produzidas no tecido gástrico normal,

na sua maioria, são provenientes da COX1 (HALTER et al., 2001), estudos recentes vem demonstrando um papel relevante da COX-2 na defesa da mucosa gastrintestinal. Brzozowski e colaboradores demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia reperusão (BRZOZOWSKI et al., 1999) e que durante a adaptação da mucosa gástrica à aspirina ocorre um aumento da expressão de COX-2, num mecanismo compensatório (KONTUREK et al., 1998). Recentemente, foi demonstrada que durante uma reação inflamatória gástrica ocorreu um aumento da expressão de COX-2 e uma adaptação da mucosa a lesão por etanol (MIYAKE et al., 2002). Souza e colaboradores demonstraram que a diminuição na lesão gástrica por aspirina em ratos com gastrite é revertida com a administração de rofecoxib, um potente inibidor seletivo da COX-2 (SOUZA et al., 2003).

Em relação à proteção gástrica pelo LPS, foi demonstrado que a administração de LPS aumentou a resistência a lesões para o etanol, através de um mecanismo dependente da produção prostaglandinas tanto pela COX-1, como pela COX-2, por aumento da sua expressão (FERRAZ et al., 1997). Ng e colaboradores sugeriram que a gastroproteção do LPS dependente de um aumento da síntese de PGEs (NG et al., 2002). Este resultado difere do obtido em nossos estudos, onde o uso de um inibidor seletivo para COX-2 (Rofecoxib) não foi capaz de reverter o efeito protetor do LPS, sugerindo dessa forma, que o mecanismo de ação do LPS na proteção da mucosa gástrica a lesões induzidas por indometacina é independente da atividade COX-2.

Foi proposto recentemente em uma revisão que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa do trato gastrintestinal (WALLACE, 2001), mas paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão da mucosa (MUSCARA et al., 1999). A presença de NO em baixas concentrações está associado aos efeitos benéficos no TGI, como o aumento na secreção de muco protetor, manutenção da barreira epitelial e da microcirculação e estimulação da reparação da mucosa. Por outro lado, o NO em altas concentrações, pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagem celulares (WALLACE & MILLER et al., 2000). Lamarque e colaboradores demonstraram que a administração de LPS foi capaz de induzir a expressão da NO sintase em células do epitélio duodenal de ratos *in vivo* (LAMARQUE et al., 2000). Os mesmos autores demonstraram ainda que o LPS, de forma dose dependente, causou um aumento das lesões gástricas, através da diminuição do fluxo sangüíneo na mucosa e aumentou expressão da NOS induzida na mucosa gástrica. A administração de aminoguanidina, um inibidor relativamente seletivo para a NOS induzida, desencadeou uma diminuição da lesão gástrica e um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa induzidos pelo LPS (LAMARQUE et al., 2000). Recentemente, Konturek e colaboradores mostraram que LPS reduziram as lesões gástricas induzidas por etanol, mas a supressão da atividade da NO sintase (NOS) pela L-NAME ou pelo L-NIL reverteu os efeitos protetores do LPS. Este resultado não foi observado em nossos experimentos. Quando utilizamos inibidores não seletivos da NO sintase (L-NAME) ou inibidores seletivos da NO sintase induzida (aminoguanidina) não foi observado nenhuma mudança no efeito

protetor do LPS, sugerindo que o óxido nítrico produzido via NO sintase induzida não participa da gastroproteção induzida pela endotoxina. Uma possível explicação para a divergência dos nossos resultados com a literatura, poderia ser o papel da NOSi na gênese da lesão. Assim, a inibição farmacológica da NOSi desencadearia uma maior inibição da lesão gástrica por indometacina. Neste sentido, Souza e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes para a NOSi apresentaram uma menor lesão gástrica por indometacina quando comparados com animais selvagens (SOUZA et al., 2004).

Apesar do tratamento com L-NAME não ter revertido à inibição da lesão gástrica por indometacina pelo LPS, foi observado um aumento na infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica. Alguns trabalhos publicados anteriormente demonstraram que a inibição da síntese de NO desencadeia um importante aumento na adesão de leucócitos ao endotélio (KUBES et al., 1991) e que somente a presença de neutrófilos na mucosa gástrica não seria capaz de desencadear a lesão gástrica (SANTUCCI et al., 1995). Uma explicação para o fato do L-NAME aumentar a infiltração de neutrófilos, mas não reverter a proteção com LPS na lesão gástrica por indometacina, poderia estar relacionado ao efeito do L-NAME sobre a NOSi dos neutrófilos recém migrados, inibindo assim a liberação de NO e substâncias reativas do nitrogênio, que são importantes mediadores da lesão gástrica (SOUZA et al., 2004).

Os corticóides constituem um grupo de drogas com efeitos antiinflamatórios e imunossupressores comumente utilizados na área biomédica. Os corticóides têm sido considerados como agentes inibidores da produção de prostaglandinas,

pela ação inibitória que exercem sobre a fosfolipase A₂, por meio da liberação de anexina-1 (mediador protéico antiinflamatório). O resultado final da ação destes antiinflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos mediadores pró-inflamatórios. Os glicocorticóides exógenos inibem a expressão da COX-2 e NOS_i, através da inibição do fator de transcrição nuclear NFκβ, reduzindo a geração de prostanóides e óxido nítrico nas células inflamatórias, porém exercem pouco ou nenhum efeito sobre a enzima constitutiva COX-1 e NOS_c (SIMON, 1999). Como observado anteriormente tanto o uso de um inibidor seletivo para COX-2, o rofecoxib, como inibidores da NOS não foram capazes de alterar o efeito protetor do LPS. O resultado obtido com o uso da dexametasona, nas duas doses testadas, esta de acordo com os nossos resultados anteriormente citados, de que prostaglandinas derivadas da enzima induzida COX -2 e o NO produzidos pela NOS_i não participam da gastroproteção mediada pelo LPS.

O LPS deve desencadear uma gastroproteção no nosso modelos por vias independentes da síntese de PGEs e NO. Outras vias de gastroproteção podem estar envolvidas no efeito protetoras do LPS na gastropatia por indometacina como a participação de mediadores como: neuropeptídeos (FREITAS, 1997), leucotrienos (PESKAR, 1991), Lipoxinas (SOUZA et al., 2004), anexina-1, o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (TAKEUCHI at al., 2001), a diminuição da hipercontractilidade antral (TAKEUCHI at al., 2001)

Tem sido postulado que os canais de potássio estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica. A

habilidade da glibenclamida e do diazóxido de alterar a resposta de algumas drogas foi utilizada para evidenciar a participação dos canais de KATP (STANDEN et al., 1989; QUAYLE et al., 1995) nos eventos biológicos. Trabalhos recentes estudando os efeitos do diazóxido, ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, e da glibenclamida, bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, demonstraram que o diazóxido inibiu as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol, e a glibenclamida apresentou aumento das lesões gástricas induzidas por etanol (RAHGOZAR et al., 2001). Um outro grupo mostrou que o diazóxido inibiu também a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos e a glibenclamida reverteu esta proteção (AKAR et al., 1999). Nossos resultados evidenciaram que a glibenclamida reverteu o efeito protetor do LPS e que a associação da glibenclamida mais diazóxido restaurou o efeito gastroprotetor do LPS. Recentemente, Peskar e colaboradores sugeriram a ação das prostaglandinas endógenas como ativadores de canais de KATP em modelos de gastroproteção (PESKAR et al., 2002). Foi também descrito que o LPS induziu a expressão de COX-2 na mucosa gástrica (FERRAZ et al., 1997). Uma explicação possível para o nosso resultado é que o LPS poderia aumentar a síntese de PGE₂ via COX-2, e dessa forma PGE₂ ativaria o canal de KATP. Mas não foi o caso. Como citado anteriormente, o tratamento com inibidores seletivos de COX-2 (Rofecoxib) não foi capaz de reverter o efeito protetor do LPS na lesão gástrica induzida por indometacina. Entretanto, a ativação dos canais KATP é também um importante mecanismo de ação de outros vasodilatadores endógenos tais como

neurotransmissores (CGRP e VIP), fatores endoteliais (NO, PGI₂) e adenosina (BRAYDEN, 2002).

Glibenclamida, um bloqueador de canais de KATP, induziu um aumento na atividade gástrica de MPO e uma diminuição nos neutrófilos periféricos no grupo tratado com LPS mais indometacina. Este resultado sugere que a glibenclamida pode diminuir a captação do neutrófilo vascular induzido pelo LPS, revertendo assim o efeito gastroprotetor induzido pela endotoxina. Quando a glibenclamida foi administrada concomitantemente com o diazóxido, o efeito gastroprotetor do LPS foi restaurado e a concentração de neutrófilos periféricos aumentados. Uma outra possibilidade é que a glibenclamida poderia induzir uma diminuição do fluxo sangüíneo gástrico e dessa forma aumentar as lesões na mucosa gástrica induzidas pela indometacina. Akar e colaboradores demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica e a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica de ratos, e que o relaxamento de artérias gástricas pré-contraídas pela noradrenalina induzida por diazóxido foi revertido pela glibenclamida. Então, estes autores sugeriram que os canais de KATP possuem uma função importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica pelo aumento da perfusão gástrica e da regulação dos neutrófilos (AKAR et al., 1999).

A glibenclamida é um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina por bloquear os canais KATP (DUNNE & PETERSEN, 1991). Por isso, pode produzir hipoglicemia. Foi relatado que a glicose pode reduzir lesão gástrica induzida por indometacina (TAKEUCHI et al., 1990). Por outro lado, Takeuchi em 1994, mostrou que o nível de glicose no sangue pode contribuir de forma

significativa no desenvolvimento de lesões na mucosa por alteração da motilidade gástrica (TAKEUCHI et al., 1994). Durante todo o nosso estudo, glibenclamida foi administrada em 2.5 ml/kg 0.02 N NaOH contendo 4% de glicose de modo a minimizar a hipoglicemia.

Foi sugerido também que a os canais de KATP possuem um papel na produção de radicais livres derivados do oxigênio induzido pelos neutrófilos em tecidos lesados (PIEPER AND GROSS, 1992). Nossos resultados demonstraram que a glibenclamida, um bloqueador de canais de KATP, reverteu o efeito do LPS na determinação do nível de glutathione. Os valores foram semelhantes ao dos animais tratados somente com indometacina. Isso sugere que a glibenclamida ao reverter o efeito protetor do LPS na gastropatia por indometacina, também possa ter aumentado a liberação de radicais livres derivados do oxigênio e conseqüentemente isso resultou em uma diminuição dos níveis de glutathione. Este nível de glutathione só foi restaurado no grupo tratado com glibenclamida associado com diazóxido, onde o efeito protetor do LPS foi mantido. Neste caso, provavelmente a liberação de radicais livres foi diminuída e os níveis de glutathione foram semelhantes ao do grupo tratado com LPS mais indometacina. A ativação dos canais de KATP poderia oferecer mecanismos protetores a injúrias por inibição da ativação dos neutrófilos e subseqüentes diminuição do consumo de glutathione, como conseqüência da diminuição da produção de radicais livres derivados do oxigênio por estes leucócitos.

Baseado no exposto acima, acreditamos que o tratamento com LPS por via endovenosa é capaz de inibir a lesão gástrica por indometacina, através da

inibição da infiltração de neutrófilos por uma diminuição da adesão de leucócitos ao endotélio e por um aumento na concentração de GSH no tecido gástrico. Este evento é dependente da abertura de KATP, visto que o pré-tratamento com glibenclamida sozinha, mas não com glibenclamida associada com diazóxido, reverteu completamente estes eventos. Nossos dados também sugerem que a atividade de COX-2 e NOS não estão envolvidas na gastroproteção do LPS. A compreensão dos mecanismos pelo qual o LPS aumenta a defesa da mucosa gastrointestinal poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas citoprotetoras.

6.0- CONCLUSÕES

6.1- O Lipopolissacarídeo de *E.coli* foi capaz de proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por indometacina.

6.2- O efeito protetor do LPS contra lesões gástricas induzidas por indometacina é em parte dependente da inibição da infiltração de neutrófilos para o sítio inflamado. Provavelmente, este efeito deve-se a uma diminuição na adesão leucocitária e aumentando no rolling dos leucócitos nas vênulas mesentéricas pós-capilares induzidos por indometacina.

6.3- LPS foi capaz de reverter o efeito da indometacina (gastropatia), aumentando de forma significativa a concentração de glutathione na mucosa gástrica.

6.5- O uso de um inibidor seletivo para COX-2 (Rofecoxib) não foi capaz de reverter o efeito protetor do LPS, sugerindo dessa forma, que o mecanismo de ação do LPS na proteção da mucosa gástrica a lesões induzidas por indometacina é independente da via da COX-2.

6.6- O uso de um inibidor seletivo e não seletivos para NOS, L-NAME e aminoguanidina, não foram capazes de reverter o efeito protetor do LPS, sugerindo dessa forma, que o mecanismo de ação do LPS na proteção da mucosa gástrica a lesões induzidas por indometacina é independente da via do NO.

6.7- O uso de um glicocorticóide, dexametasona, não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor do LPS.

6.7- O efeito protetor dos LPS na lesão gástrica induzida por indometacina foi mediado, em parte, pela ativação dos canais de KATP. Pois, a glibenclamida reverteu o efeito protetor do LPS e a associação da glibenclamida mais diazóxido restaurou o efeito gastroprotetor do LPS.

7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alle, N.; Alle-Filho, N. Estudo em ratos das propriedades antiinflamatórias das drogas: Indometacina, Butazona, Clinoril, Naprosyn, Benflogin e Inflaril, na fase aguda da inflamação. **Rev. Odontol. Univ. De São Paulo**, 6(1/2) : 31-6,1992.

Akar, F.; Uydes-Dogan, B.S.; Buharalioglu, C.K.; Abban, G.; Heinemann, A.; Holzer, P.; Van de Voorde, J. Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. **Eur. J. Pharmacol.** 25,461-470, 1999.

Appleyard, C.B.; McCafferty, D.M.; Tigley, A.W.; Swain, M.G.; Wallace, J.L. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. **Am J Physiol.**, 270(1 Pt 1):G42-8,1996.

Ashcroft, F. M.; Harrison, D. E.; Ashcroft, S. J. H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature**, 312:446-448, 1984.

Ashcroft, FM. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. **Annu Rev Neurosci.**,11:97-118, 1998.

Ashford, M.L.; Sturgess, N.C.; Trout, N.J.; Gardner, N.J.; Hales, C.N. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. **Pflugers Arch.**, 412(3):297-304,1988.

Barros, J.A.C. Balconistas de farmácia ajudando a promover o uso racional de medicamentos? **Jornal Brasileiro de Medicina**, 73(2):120-127, 1997.

Boughton-Smith, N. K.; Evans, S. M.; Laszlo, F.; Whittle, B. J.; Moncada, S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, n. 3, p. 1189-1195, 1993.

Bradley, P.P.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, 60, 618-622, 1982.

Brayden, J.E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 29, 312-316, 2002.

Brzozowski, T.; Konturek, P.C.; Konturek, S.J.; Sliwowski, Z.; Drozdowicz, D.; Stachura, J.; Pajdo, R.; Hahn, E.G. Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Eur J Pharmacol.**, 26; 385(1): 47-6, 1999.

Burnett, W.G.; Schuster, S.G. **Review of Pathogenic Microbiology**. 1 st. Ed., The C.V. Most Company, St Louis. Pp. 228-223,1974.

Calatayud, S.; Canet, A.; Bello, R.; Hernández, C.; Marti, M.; Barrachina, M.D. Low endotoxemia prevents the reduction of gastric blood flow induced by NSAIDs: role of nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 139, 263-70, 2003.

Castaneda, A.A.; Denning, J.W.; Chang, L.; Mercer, D.W. Does upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) render the stomach more susceptible to damage? **J. Surg. Res.**, v. 84, n. 2, p. 174-179, 1999.

Castilho, L.S.; Resende, V.L.; Paixão, H.H. Os antiinflamatórios não-esteróides inibidores de síntese de prostaglandinas mais utilizadas em odontologia. **Revista do CROMG.**, 4(1): 32-7,1998.

Chan, C.C.; Boyce, S.; Brideau, C., Ford-Hutchinson, A.W.; Gordon, R.; Guay, D.; Hill, R.G.; Li, C.S.; Mancini, J.; Penneton, M., et al. Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745, 337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. Pharmacol Exp Ther., 274(3):1531-7, 1995.

Chan, C.C.; Boyce, S.; Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W.; Ethier, D.; Evans, J.; Ford-Hutchinson, A.W.; Forrest, M.J.; Gauthier, J.Y.; Gordon, R.; Gresser, M.; Guay, J.; Kargman, S.; Kennedy, B.; Leblanc, Y.; Leger, S.; Mancini, J.; O'Neill, G.P.; Ouellet, M.; Patrick, D.; Percival, M.D.; Perrier, H.;

Prasit, P.; Rodger, I.; et al. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. J Pharmacol Exp Ther.,290(2):551-60, 1999.

Christopher J.H. Non steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. Gastroenterology, 119, 2000.

Coelho, L.G.V. Úlcera péptica gastroduodenal. In: Dani R, editor. **Gastroenterology essencial**. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.132-46, 1998.

Conger, J.D. Endothelial regulation of vascular tone. **Hosp Pract (Off Ed)**. Oct 15;29(10):117-22,1994.

Cunha, F.Q.; Moncada S.; Liew, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 14, 1155-1159, 1992.

Cunha, F.Q.; Souza, G.E.; Souza, C.A.; Cerqueira, B.C.; Ferreira, S.H. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **Br. J. Exp. Pathol.**, 70, 1-8, 1989.

Da Silva-Santos, J.E.; Santos-Silva, M.C.; Cunha, F. Q.; Assreuy, J.; The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. **J Pharmacol Exp. Ther.**, 300, 946-51, 2002.

Davies, M.G.; Fulton, G.J.; Hagen, P.O. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg.**, 82(12):1598-610, 1995.

Dunne, M.J.; Petersen, O.H. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. **Biochim. Biophys Acta.** 7,67-82,1991.

Elliott, S.N.; McKnight, W.; Cirino, G.; Wallace, J.L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology.** Aug;109(2):524-30, 1995.

Ferraz, J.G.; Sharkey, K.A.; Reuter, B.K.; Asfaha, S.; Tigley, A.W.; Brown, M. L.; Mcknight, W.; Wallace, J.L. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology**, 113, 195-204, 1997.

Forstermann, U.; Closs, E.I.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Schwarz, P.; Gath, I.; Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension.**, 23(6 Pt 2):1121-31,1994.

Fortes, Z.B.; Farsky, S.P.; Oliveira, M.A.; Garcia-Leme, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interactions in diabetes mellitus. **Diabetes**, 40, 1267–1273, 1991.

Freitas, J.R. **Terapêutica Odontológica: farmacologia / Dentistry therapeutic: pharmacology.** Rio de Janeiro; Pedro Primeiro; 281p, 1997.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 27; 288(5789):373-6, 1980.

Gana, T.J.; Huhlewych, R.; Koo, J. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. **Ann. Surg.**, 205, 399-403. 1987.

Goncalves de Moraes, V.L.; Boris Vargaftig, B.; Lefort, J.; Meager, A.; Chignard, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **Br J Pharmacol.**, 117(8): 1792-6, 1996.

Granger, D.N.; Benoit, J.N.; Suzuki, M.; Grisham, M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia–reperfusion, **Am. J. Physiol.**, 257, G683–G688, 1989.

Halter, F.; Tarnawski, A.S.; Schmassmann, A.; Peskar, B.M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut.**, 49(3):443-53, 2001.

Hawkey, C.J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, 15(5):801-20, 2001.

Katsung, B.G. **Farmacologia (Básica & Clínica)** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 408-423, 854p, 1998.

Kiechele, F.L.; Malinski, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.**, 100:567-75, 1993.

Kitahora, T.; Guth, P.H. Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. **Gastroenterology.**, 93(4):810-7, 1997.

Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Sliwowski, Z.; Pajdo, R.; Stachura, J.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in

gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. **Scand. J. Gastroenterol.**, 33, n. 7, p. 691-700, 1998.

Konturek, P.C.; Brzozowski, T.; Meixner, H.; Ptak, A.; Hahn, E.G.; Konturek, S.J. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. **J. Physiol. Pharmacol.**, 52, 611-623, 2001.

Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 1;88(11):4651-5, 1991.

Kuo, P.C.; Schroeder, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann Surg.**, 221(3):220-35, 1995.

Lamarque, D.; Moran, A. P.; Szepes, Z.; Delchier, J. C.; Whittle, B. J. Cytotoxicity associated with induction of nitric oxide synthase in rat duodenal epithelial cells *in vivo* by lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori*: inhibition by superoxide dismutase. **Br. J. Pharmacol.**, 130, n. 7, p. 1531-1538, 2000.

Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tiano, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada P.C.; Mahler, J.F.; Lee, C.A.; Goulding, E.H.; Kluckman, K.D.; Kim, H.S.; Smithies, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell.**, 3;83 (3):483-92, 1995.

Martich, G.D.; Danner, R.L.; Ceska, M.; Suffredini, A.F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. **J Exp Med.**, 1; 173(4): 1021-4, 1991.

Miyake, K.; Tsukui, T.; Wada, K.; Tatsuguchi, A.; Futagami, S.; Hiratsuka, T.; Shinoki, K.; Iizumi, T.; Akamatsu, T.; Sakamoto, C.; Kobayashi, M. Irritant-induced cyclooxygenase-2 is involved in the defense mechanism of the gastric mucosa in mice. **J Gastroenterol.**, 37(3):164-71, 2002.

Morise, Z.; Komatsu, S.; Fuseler, J.W.; Granger, D.N.; Perry, M.; Issekutz, A.C.; Grisham, M.B. ICAM-1 and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. **Am J Physiol.** 274(2 Pt 1): G246-52, 1998.

Morise, Z.; Granger, D.N.; Fuseler, J.W.; Anderson, D.C.; Grisham, M.B. Indomethacin induced gastropathy in CD18, intercellular adhesion molecule 1, or P-selectin deficient mice. **Gut.**, 45(4):523-8, 1999.

Morrison, D.C.; Ulevitch, R.J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. **Am. J. Pathol.**, 93, 526-617. 1978.

Mukherjee, D.; Nissen, S.E.; Topol, E.J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, 286: 954-959, 2001.

Muscara, M.N.; Wallace, J.L. Nitric Oxide, V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.** 276(6 Pt 1): G1313-6, 1999.

Ng, C.J.; Chen, J.C.; Chiu, D.F.; Chen, M.F.; Chen, H.M. Role of prostacyclin on microcirculation in endotoxin-induced gastroprotection in rats: a microdialysis study. **Shock.**, 17(4):334-8, 2002.

Nisengard, R.J.; Newman, M.G. Oral Microbiology and Immunology. Saunders W B Co, 1994.

Olivero, J.J.; Graham, D.Y. Gastric adaptation to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in man. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, 193:53-8, 1994.

Palmer, R.M.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**, 11-17;327(6122):524-6, 1987.

Palmer, R.M.; Ashton, D.S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature.**, 16;333(6174):664-6, 1988.

Pearson, J.M.; Schultze, A.E.; Jean, P.A.; Roth, R.A. Platelet participation in liver injury from gram-negative bacterial lipopolysaccharide in the rat. **Shock** 4, 178-186, 1995.

Peskar, B.M. Leukotrienes in mucosal damage and protection. **J Physiol Pharmacol.**, 42(2):135-45,1991.

Peskar, B. M.; Ehrlich, K.; Peskar, B. A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 301, 969-974, 2002.

Pieper, G.M., Gross, G.J. Anti-free-radical and neutrophil-modulating properties of the nitrovasodilator, nicorandil. **Cardiovasc Drugs Ther.**, 6, 225-232, 1992.

Quayle, J.M.; Bonev, A.D.; Brayden, J.E.; Nelson, M.T. Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. **Am. J. Physiol.** 269, 1112-1118, 1995.

Rahgozar, M.; Pazokitoroudi, H.; Bakhtiarian, A.; Djahanguiri, B. Diazoxide, a K(ATP) opener, accelerates restitution of ethanol or indomethacin-induced gastric ulceration in rats independent of polyamines. **J Gastroenterol Hepatol.**, 16(3):290-6, 2001.

Rocha, N.P.; Ferreira, S.H. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **Eur. J. Pharmacol.**, 11, 87-92, 1986.

Rorsman, P.; Trube, G. Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic β -cells are regulated by intracellular ATP. **Pflügers Arch.**, 405:305-309. 1985.

Rosenbaum, J.T.; Hartiala, K.T.; Webster, R.O.; Howes, E.L.; Jr. Goldstein I.M. Antiinflammatory effects of endotoxin. Inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte responses to complement (C5)-derived peptides in vivo and in vitro. **Am. J. Pathol.**, 113, 291-299, 1983.

Sakuma, H; Arakawa, T; Kobayashi, K. Effects of active oxygen species on damage to and prostaglandin synthesis in cultured rat gastric cells. **Osaka City Med J.**, 38(1):45-65, 1992.

Salvemini, D.; Wang, Z.; Wyatt, P.S.; Bourdon, D.M.; Marino, M.H.; Manning, P.T.; Currie, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Pharmacol., 118:829-38, 1996.

Santucci, L.; Fiorucci, S.; Giansanti, M.; Brunori, P.M.; Di Matteo, F.M.; Morelli, A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut.**, 35, 909-915, 1994.

Santucci, L.; Fiorucci, S.; Di Matteo, F.M.; Morelli, A. Role of tumor necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats. **Gastroenterology**, 108(2):393-401, 1995.

Satoh, H.; Inada, I.; Hirata, T.; Maki, Y. Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refeed rat. **Gastroenterology**, 81(4):719-25, 1981.

Schutz, A.B. Estudo comparativo dos efeitos biológicos do Tenoxicam, Indometacina, Dexametasona e Metotrexato em granulomas induzidos pela placa microbiana dental. **Revista Faculdade de Odontologia Bauru**, 5(3/4):1-8, 1997.

Scott, L.J.; Lamb, H.M. **Rofecoxib Drugs**, Sep;58(3):499-505, 1999.

Secco, D.D.; Paron, J.A.; de Oliveira S.H.; Ferreira. S.H.; Silva, J.S.; Cunha, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, 9(3):153-64, 2003.

Sedlak, J.; Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, 24;25(1):192-205, 1968.

Simon, L,S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation.

Am J Med., 31;106(5B):37S-42, 1999.

Singh, G.; Ramey, D.R.; Morfeld, D.; Shi, H.; Hatoum, H.T.; Fries, J.F. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal antiinflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis a prospective observational cohort study. **Arch Intern Med**, 156:1530-6, 1996.

Sobey, C.G. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Jan;21(1):28-38, 2001.

Souza, M.H.; Troncon, L.E.; Cunha, F.Q.; Oliveira, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res.**, 36, 1383-1390, 2003.

Souza, M.H.; Lemos, H.P.; Oliveira, R.B.; Cunha, F.Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut.**, 53, 791-796, 2004.

Spruce, A.E.; Standen, N.B.; Stanfield, P.R. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. **Nature.**, Aug 22-28;316(6030):736-8, 1985.

Standen, N.B.; Quayle, J.M.; Davies, N.W.; Brayden, J.E.; Huang, Y.; Nelson, M.T. 1989. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. **Science**, 14, 177-180, 1989.

Sugita, H.; Kaneki, M.; Tokunaga, E.; Sugita, M.; Koike, C.; Yasuhara, S.; Tompkins, R.G.; Martín, J.A. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. **Am. J. Physiol .Endocrinol. Metab.**, 28, 386-394, 2002.

Takeuchi, K.; Okada, M.; Niida, H.; Okabe, S. Possible mechanisms involved in gastric hypermotility caused by indomethacin in the rat. Role of glycoprivic response. **Dig. Dis. Sci.**, 35, 984-992, 1990.

Takeuchi, K.; Niida, H.; Ohuchi, T.; Okabe, S. Influences of urethane anesthesia on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. Relation to blood glucose levels. **Dig. Dis. Sci.**, 39, 2536-2542, 1994.

Takeuchi, K.; Suzuki, K.; Araki, H.; Mizoguchi, H.; Sugamoto, S.; Umdeda, M. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. **Physiol, Paris.**, Nov;93(5):423-31, 1999.

Takeuchi, K.; Mizoguchi, H.; Araki, H.; Komoike, Y.; Suzuki, K. Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX-530, in experimental animals. **Dig Dis Sci.**, Aug;46(8):1805-18, 2001.

Tavares-Murta, B.M.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol.**, Aug;124(7):1369-74, 1998.

Tavares-Murta, B.M.; Machado, J.S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, 25, 247-253, 2001.

Terzic, A.; Jahangir, A.; Kurachi, Y. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. **Am J Physiol.**, Sep;269(3 Pt 1):C525-45, 1995.

Thomazzi, S.M.; Souza, M.H.; Melo-Filho, A.A.; Hewlett, E.L.; Lima, A.A.; Ribeiro, R.A. Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* blocks neutrophil migration and neutrophil-dependent edema in response to inflammation. **Braz J Med Biol Res.**, 28, 120-124, 1995.

Toroudi, H.P.; Rahgozar, M.; Bakhtiarian, A.; Djahanguiri, B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Scand J Gastroenterol.**, Oct;34(10):962-6, 1999.

Ueshima, K.; Takeuchi, K.; Okabe, S. Effects of sulfhydryl-related compounds on indomethacin-induced gastric lesions in rats: role of endogenous sulfhydryls in the pathogenesis. **Jpn J Pharmacol.**, Feb;58(2):157-65, 1992.

Utsunomiya, I.; Nagai, S.; Oh-ishi, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. **Eur J Pharmacol.**, Feb 3;252(2):213-8, 1994.

Vaananen, P.M.; Meddings, J.B.; Wallace, J.L. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. **Am J Physiol.** 261, 470-475, 1991.

Vane, J.R.; Mitchell, J.A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtall, J.; Willoughby, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Mar 15;91(6):2046-50, 1994.

Wagner, J.G.; Harkema, J.R.; Roth, R.A. Pulmonary leukostasis and the inhibition of airway neutrophil recruitment are early events in the endotoxemic rat. **Shock**, 17, 151-158, 2002.

Wallace, J.L.; Keenan, C.M.; Granger, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. **Am. J. Physiol.**, 259, 462-467, 1990.

Wallace, J.L.; Arfors, K.E.; McKnight, G.W. A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. **Gastroenterology**, 100,878-83, 1991.

Wallace, J.L.; McKnight, W.; Miyasaka, M.; Tamatati, T.; Pauson, J.; Anderson, D.C.; Granger, D.N.; Kubes, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **Am J Physiol.**, Nov;265(5 Pt 1):G993,1993.

Wallace, J.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. **Gastroenterology**, 112, 1000-1016, 1997.

Wallace JL. How do NSAIDs cause ulcer disease? Baillieres Best Pract Res Clin **Gastroenterol**, 14:147-59, 2000.

Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, Aug;119(2):512-20,2000.

Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp Biol Med (Maywood)**., Dec; 226(11): 1003-15 2001.

Wannmacher, L.; Ferreira, M.B.C. **Farmacologia clínica para dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;, 1995.

Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N Eng J Méd**, 320:365-76, 1989.

Wong, M.L.; Bongiorno, P.B.; al-Shekhlee, A.; Esposito, A.; Khatri, P.; Licinio, J. IL-1 beta, IL-1 receptor type I and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. **Neuroreport.**, 4;7(15-17):2445-8, 1996.

Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Apr 1;88(7):2692-6,1991.

8.0- ANEXO



Available online at www.sciencedirect.com



European Journal of Pharmacology 547 (2006) 136–142



www.elsevier.com/locate/ejphar

LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats—Role of ATP-sensitive potassium channels

Antoniella S. Gomes^a, Livia M.F. Lima^a, Camila L. Santos^a, Fernando Q. Cunha^b,
Ronaldo A. Ribeiro^a, Marcellus H.L.P. Souza^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará-Brazil

^b Department of Pharmacology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo-Brazil

Received 10 November 2005; received in revised form 16 June 2006; accepted 11 July 2006

Available online 25 July 2006

Abstract

The effect of lipopolysaccharide (LPS) in gastric protection has not been elucidated, but ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels are known to be involved in gastric defense. We evaluated the effect of LPS administration on indomethacin-induced gastropathy, and the role of K_{ATP} channels in this event. Rats received intravenous (i.v.) LPS administration. After 1/2, 6, 24 or 48 h, indomethacin was injected. 3 h later, gastric damage and myeloperoxidase activity were determined. Another group received LPS and 5 h later, glibenclamide, diazoxide or glibenclamide plus diazoxide. After 1 h, the rats received indomethacin and 3 h later, gastric damage and myeloperoxidase activity were evaluated. LPS reduced dose dependently gastric damage and myeloperoxidase activity induced by indomethacin. Glibenclamide reversed this LPS effect on indomethacin-induced gastropathy. Glibenclamide plus diazoxide administration did not change this LPS effect. Thus LPS has a protective effect against indomethacin-induced gastropathy, probably through activation of K_{ATP} channels.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Indomethacin; Gastric damage; ATP-sensitive potassium channels; Lipopolysaccharide

1. Introduction

A major limitation to the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for the treatment of chronic inflammatory diseases is the development of gastric mucosal injury. It has been shown that leukocyte adherence to the vascular endothelium (Wallace et al., 1991), microcirculatory disturbances (Ashley et al., 1985; Gana et al., 1987), superoxide radicals and protease liberation (Vaananen et al., 1991) may be critical events in the pathogenesis of NSAID-induced gastropathy (Wallace, 1997).

Bacterial lipopolysaccharide LPS is a key mediator of many of the host responses resulting from gram-negative bacteremia and

sepsis (Sugita et al., 2002). It was demonstrated that large amounts of endotoxin might produced hemorrhagic lesions in the stomach (Castaneda et al., 1999). Although, Ferraz et al. (1997) showed that repeated exposure to endotoxin resulted in increased resistance of the gastric mucosa to injury through a prostaglandin-dependent pathway. More recently, Konturek et al. (2001) demonstrated that LPS applied centrally or peripherally protected gastric mucosa against ethanol-induced damage by increasing the gastric microcirculation, mediated by nitric oxide (NO) due to overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS).

K_{ATP} channel activity is involved in several physiological events such as insulin secretion and relaxation of vascular smooth muscle (Da Silva-Santos et al., 2002). K_{ATP} channels have been identified in various tissues, including pancreatic β -cells, skeletal and vascular muscle, brain and kidney (Seino, 1999). Recently, Sim et al. (2002) showed, using patch-clamp recording and RT-polymerase chain reaction (PCR), that the K_{ATP} channels in smooth muscle cells of the guinea pig stomach are composed of Kir6.1 and

* Corresponding author. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brasil, CEP: 60.431-970. Fax: +55 85 2888333.

E-mail address: souzamar@ufc.br (M.H.L.P. Souza).

SUR2B. Akar et al. (1999) demonstrated that the gastric damage induced by indomethacin in rats was aggravated by the blocker of K_{ATP} channels, glibenclamide, and inhibited by activators of these channels, such as cromakalim or diazoxide. At the present, the role of K_{ATP} channels in the protective effect of LPS in NSAID-induced gastric damage has not been defined.

In the present study, our aims were to investigate the effect of LPS on indomethacin-induced gastric damage, and the effect of glibenclamide (blocker of K_{ATP} channels) or diazoxide (activator of K_{ATP} channels) on this action.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (weight 200–250 g) were fasted for 18–24 h before the experiments. The animals were housed in cages in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. All animal treatments and surgical procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

2.2. Drugs

Lipopolysaccharides the *Escherichia coli* (0111:B4), diazoxide, glibenclamide, *O*-dianisidine dihydrochloride and hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) were all purchased from Sigma Chemicals (St.Louis, MO, USA). Indomethacin was purchased from Prodome Química e Farmacêutica, São Paulo, São Paulo, Brazil, and Tris buffer from Merck, São Paulo, São Paulo, Brazil. Indomethacin was dissolved in Tris buffer (concentration of 8 mg/ml), glibenclamide in 4% glucose and 0.02 N NaOH (concentration of 133, 400 or 1200 μ g/ml), diazoxide in 0.05 N NaOH (concentration of 1.2 mg/ml), and LPS in saline.

2.3. LPS from *E. coli* in indomethacin-induced gastric damage

Groups of five to ten rats were treated i.v. with saline or LPS at the doses 30, 100, 300 μ g/kg. LPS was dissolved in saline. At the end of 6 h, indomethacin (20 mg/kg) dissolved in Tris buffer was administered by gavage. The control group received only the vehicle (Tris buffer). 3 h later, the animals were killed by cervical dislocation. The stomachs were rapidly removed, opened by an incision along the greater curvature and pinned out on a wax platform. The hemorrhagic or ulcerative lesions were counted and their lengths measured with a digital caliper. A gastric damage score was then calculated as the sum of the lengths of all linear erosions (Santucci et al., 1994), measured by an observer who was unaware of the treatment given to the animals (ASG). Full-thickness pieces of the gastric corpus were then weighed, frozen and stored at -70 °C until the assay for myeloperoxidase activity. Punch samples of the heart were collected for determination of the total and differential number of white blood cells.

2.4. LPS from *E. coli* in Indomethacin-induced gastric damage — time course

Groups of five to ten rats were treated i.v. with saline or LPS (300 μ g/kg). At the end of 1/2, 6, 24 or 48 h, indomethacin (20 mg/kg) was administered by gavage. The control group received only the vehicle (Tris buffer). 3 h after indomethacin treatment, gastric damage was determined as described above. Finally, full-thickness pieces of the gastric corpus were weighed, frozen and stored at -70 °C until the assay for myeloperoxidase activity.

2.5. ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels and the LPS protective effect

To investigate the role of K_{ATP} channels in the LPS effect, groups of five and ten animals were treated with saline or LPS (300 μ g/kg). At the end of 5 h, glibenclamide (0.3, 1, 3 mg/kg, by gavage), diazoxide (3 mg/kg, i.p.), or glibenclamide (1 mg/kg, by gavage) plus diazoxide (3 mg/kg, i.p.) was administered. Furthermore, in order to study the effect of glibenclamide on gastric integrity, another control group received only glibenclamide (1 mg/kg). 1 h later, gastric damage was induced by intragastric instillation of indomethacin (20 mg/kg). The control group (saline) received only vehicles. 3 h later, gastric damage was determined as described above. Finally, full-thickness pieces

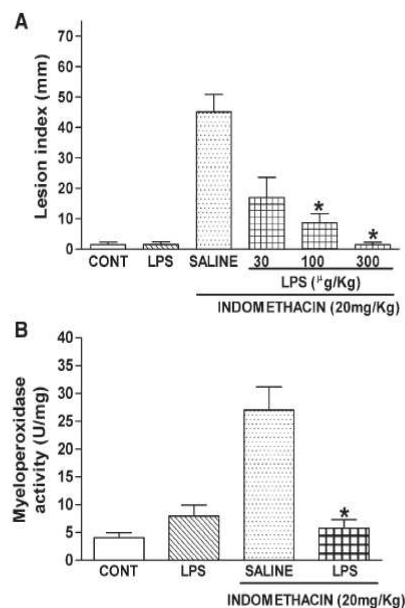


Fig. 1. Effect of LPS against gastric damage and gastric myeloperoxidase activity induced by indomethacin. The rats were treated with saline or LPS. 6 h later, indomethacin (20 mg/kg) was administered. The control group (CONT) was treated with Saline/Tris buffer. Gastric lesions (panel A) and gastric myeloperoxidase activity (panel B) were determined after 3 h. The results are expressed as the means \pm S.E.M. for at least five animals per group. (*) $P < 0.001$, when compared with the indomethacin group. ANOVA and Newman-Keuls test.

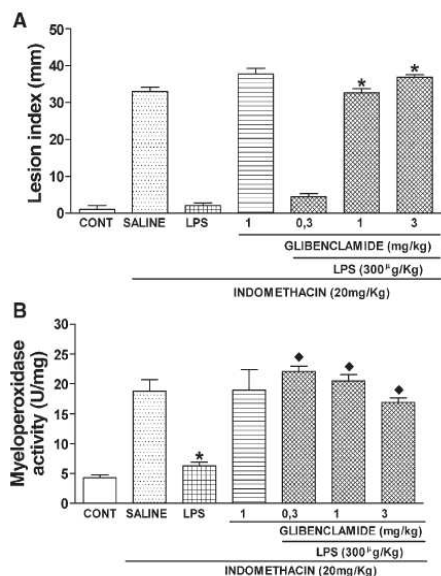


Fig. 3. Glibenclamide (blocker of K_{ATP} channel) reversed the LPS protective effect against indomethacin-induced gastric damage and increase in myeloperoxidase activity. The rats were treated with LPS (300 μ g/kg). After 5 h, glibenclamide (blocker of K_{ATP} channels), at the doses of 0.3, 1, 3 mg/kg, was administered by gavage. 1 h later, indomethacin (20 mg/kg) was injected. The control group (CONT) was treated with Tris buffer. 3 h later, gastric damage and gastric Myeloperoxidase activity were determined. The results are expressed as the means \pm S.E.M. for at least five animals per group. (*) $P < 0.001$, when compared with the LPS group (panel A and panel B). (♦) $P < 0.001$, when compared with the glibenclamide plus LPS plus indomethacin group (panel A and panel B). ANOVA and Newman–Keuls test.

analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test, when appropriate. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. The protective effect of LPS from *E. coli* against indomethacin-induced gastropathy

Fig. 1 shows that LPS reduced dose dependently ($P < 0.001$) indomethacin-induced gastric damage (panel A) and the increase in myeloperoxidase activity (panel B), with the maximal effect at the dose of 300 μ g/kg.

Fig. 2 demonstrates that LPS treatment, at the dose of 300 μ g/kg, decreased the gastric damage (panel A) and gastric myeloperoxidase activity (panel B) induced by indomethacin, with the maximal effect after of six 6 h. Furthermore, 48 h after a single administration of LPS, the indomethacin-induced gastric damage remained partially reduced.

Table 1 shows that rats in the LPS plus indomethacin group had higher leukocyte and neutrophil counts than did rats in the indomethacin plus saline group. LPS alone increased only the neutrophil counts compared with saline (control).

Table 2 shows that in the LPS plus indomethacin group the blood glucose level compared with control group (saline) and indomethacin alone group was not different.

3.2. Role of K_{ATP} channels in the protective effect of LPS against indomethacin-induced gastropathy

Treatment with glibenclamide dose dependently reversed the LPS protective effect against gastric damage (Fig. 3, panel A) and the increase in gastric myeloperoxidase activity (Fig. 3, panel B) induced by indomethacin, with a maximal effect at the dose of 1 mg/kg. Cotreatment with glibenclamide and indomethacin did not change the indomethacin-induced gastric damage and increase in gastric myeloperoxidase activity (Fig. 3, panel A and B).

Diazoxide treatment at the dose of 3 mg/kg did not modify this protective effect of LPS against gastric damage (Fig. 4, panel A) and the increase in gastric myeloperoxidase activity (Fig. 4, panel B) induced by indomethacin.

Glibenclamide plus diazoxide restored the protective effect of LPS (Fig. 5, panel A) against indomethacin-induced gastric

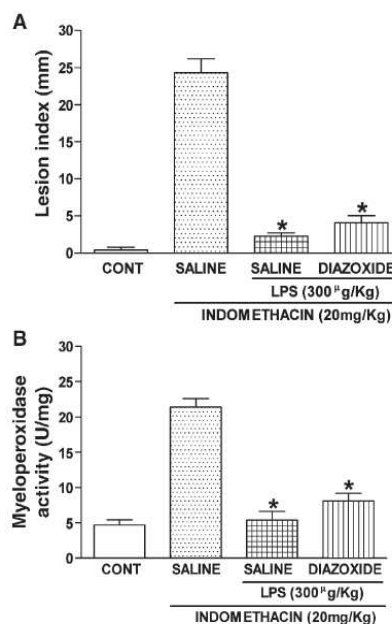


Fig. 4. Diazoxide (activator of K_{ATP} channel) did not change the LPS protective effect against indomethacin-induced gastric damage and increase in myeloperoxidase activity. The animals were treated with then LPS (300 μ g/kg). After 5 h, the rats received diazoxide (activators of K_{ATP} channels, 3 mg/kg) by i.p. injection. 1 h later, indomethacin (20 mg/kg) was administered. The control group (CONT) was treated with Tris buffer. 3 h later, gastric damage and gastric myeloperoxidase activity were determined. The results are expressed as the means \pm S.E.M. for at least five animals per group. (*) $P < 0.001$, when compared with indomethacin group (panel A and panel B). ANOVA and Newman–Keuls test.

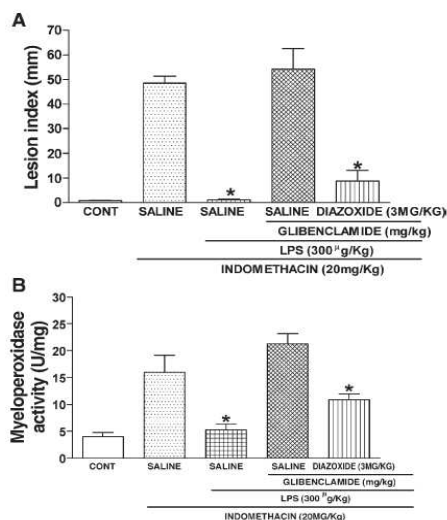


Fig. 5. The effect of diazoxide plus glibenclamide on the LPS protective effect against indomethacin-induced gastric damage in rats. The animals were treated with LPS (300 µg/kg). After 5 h, the animals were treated with glibenclamide (1 mg/kg) alone or with diazoxide (3 mg/kg). The control group (CONT) was treated with Tris buffer. 3 h later, gastric damage and gastric myeloperoxidase activity were determined. The results are expressed as the means ± S.E.M. for at least five animals per group. (*) $P < 0.001$, when compared with the glibenclamide alone group. ANOVA and Newman–Keuls test.

damage and increase in gastric myeloperoxidase activity (Fig. 5, panel B).

Table 1 shows that cotreatment with glibenclamide decreased the increase in total leukocyte and neutrophil counts in the LPS plus indomethacin group. In contrast, glibenclamide plus diazoxide treatment increased the leukocyte and neutrophil counts when compared with those in the glibenclamide group.

Table 2 shows that treatment with glibenclamide, alone or with diazoxide, did not modify the blood glucose levels when compared with those of the control group (saline) or indomethacin alone group.

4. Discussion

In this study we investigated the effect of LPS injection on the gastric mucosal defense, using a classic model of gastric inflammation, indomethacin-induced gastropathy. Our results showed that LPS treatment decreased the gastric damage and gastric myeloperoxidase activity induced by indomethacin. Recently, Peskar et al. (2002) demonstrated the involvement of K_{ATP} in various forms of gastric protection, such as 16, 16-dimethyl-prostaglandin E_2 , 20% ethanol, sodium salicylate. However, the role of K_{ATP} in the protection provided by LPS against indomethacin-induced gastric damage has not been defined. Using a pharmacological approach, with glibenclamide

(a blocker of K_{ATP} channel) or diazoxide (an activator of K_{ATP} channel), we demonstrated that LPS has a protective effect against indomethacin-induced gastric damage, an effect mediated, at least in part, by activation of K_{ATP} channels.

Oral administration of indomethacin (20 mg/kg) to rats results in hemorrhagic erosions in the stomach (Wallace et al., 1990; Souza et al., 2003). A single dose of LPS abolished completely the gastric damage, with the maximal effect at the dose of 300 µg/kg and after 6 h. Furthermore, this protective effect of LPS persisted partially for at least 48 h. Our results are in agreement with the recent literature, Calatayud et al. (2003) demonstrated that LPS administration preserved blood perfusion and protected the gastric mucosa against the indomethacin induced gastric damage. Our results also showed that LPS decreased the gastric neutrophil infiltration, measured by myeloperoxidase activity, induced by indomethacin. It has been described that LPS i.v. administration can decrease neutrophil migration during the inflammatory process (Rocha and Ferreira, 1986; Thomazzi et al., 1995; Tavares-Murta et al., 2001), and that indomethacin-induced gastric damage is a neutrophil-dependent process (Wallace et al., 1990 e Souza et al., 2004). Furthermore, Ding et al. (1998) suggested that indomethacin induced an increase in neutrophil infiltration by an increase in TNF- α concentration in the gastric mucosa. Our results suggested that the LPS protective effect against indomethacin-induced gastric damage is in part dependent on inhibition of neutrophil infiltration.

Gram-negative bacteremia or circulating endotoxin can suppress several components of the inflammatory response, including neutrophil migration (Rosenbaum et al., 1983; Cunha et al., 1989; Thomazzi et al., 1995). The mechanisms responsible for the inhibition of neutrophil migration induced by LPS have not been fully determined. Many mechanisms, such as leucopenia (Morrison and Ulevitch, 1978), a continuous release of chemotactic factors in the circulation (Cunha et al., 1989; Cunha et al., 1992; Wagner et al., 2002), an increase in NO production by iNOS (Tavares-Murta et al., 2001), activation of coagulation system (Pearson et al., 1995) and vascular sequestration of neutrophils (Wagner et al., 2002), could be implicated. Our results showed that i.v. administration of LPS did not induce leucopenia. As can be seen from Table 1, LPS increased the blood neutrophil counts during indomethacin-induced gastric damage. One other possibility is that endotoxin could induce vascular sequestration of neutrophils, and then decrease neutrophil migration to the gastric mucosa and increase the peripheral neutrophil count. However our results do not rule out the possibility that other mechanisms could be involved.

The ability of glibenclamide and diazoxide to change the response to some agents has been used as evidence for the involvement of K_{ATP} channels (Standen et al., 1989; Quayle et al., 1995) in biologic events. Our results showed that glibenclamide reversed the LPS protective effect and that co-administration of diazoxide and glibenclamide restored the protective effect of LPS. Recently, Peskar et al. (2002) suggested that endogenous prostaglandins act as activators of K_{ATP} channels in many types of gastroprotection. It has also been reported that LPS induces

cyclooxygenase 2 (COX-2) expression in gastric mucosa (Ferraz et al., 1997). One possible explanation of our results is that LPS could increase the gastric prostaglandin E₂ synthesis by inducible COX-2, and then prostaglandin E₂ activated the K_{ATP} channel. But this is not the case. Treatment with selective COX-2 inhibitors (Rofecoxib) did not reverse the LPS protective effect in indomethacin-induced gastropathy (data not show). However, the activation of K_{ATP} channels is also an important mechanism of action of other endogenous vasodilators, such as neurotransmitters calcitonin gene related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP), endothelial factors (NO, prostaglandin E₁) and adenosine (Brayden, 2002).

Glibenclamide, a blocker of K_{ATP} channels, induced an increase in gastric myeloperoxidase activity and a decrease in neutrophil counts in LPS plus indomethacin group. This result in our opinion suggests that glibenclamide could decrease the neutrophil vascular sequestration induced by LPS, and then reverse the LPS gastroprotection. When glibenclamide was administered with diazoxide, the LPS gastroprotection was restored (Fig. 5) and the peripheral neutrophil count increased (Table 2). Another possibility is that glibenclamide could induce a decrease in gastric blood flow and then increase indomethacin-induced gastric damage. Akar et al. demonstrated that diazoxide reduced indomethacin-induced gastric damage and neutrophil infiltration in rats, and the relaxation of noradrenaline pre-contracted gastric arteries induced by diazoxide was reversed by glibenclamide. Akar et al. (1999) suggested that K_{ATP} channels had a role in the maintenance of gastric mucosal integrity by increasing gastric perfusion and regulating neutrophil function.

Our results showed also that glibenclamide without LPS did not modify the gastric damage induced by indomethacin. These results are in apparent contradiction with the increase in indomethacin-induced gastric damage by glibenclamide treatment reported by Akar et al. (1999). One possible explanation for this is that the glibenclamide dose used by Akar et al. (1999) was tenfold greater than the dose used by us.

Glibenclamide is an oral hypoglycemic agent that stimulates insulin secretion by blocking K_{ATP} channels (Dunne and Petersen, 1991), producing hypoglycemia. It has been reported that glucose reduces indomethacin-induced gastric damage (Takeuchi et al., 1990). The blood glucose level plays a critical role in the development of gastric lesions by modifying gastric motility (Takeuchi et al., 1994). In this study, glibenclamide was administered in 2.5 ml/kg 0.02 N NaOH containing 4% glucose to minimize hypoglycemia. We found that glibenclamide, alone or with diazoxide, did not change the level glucose blood in the study groups when compared with saline (control). Thus we can conclude that the effect of glibenclamide on LPS-induced gastric protection is not dependent on hypoglycemia.

It has been also suggested that K_{ATP} channels play a significant role in regulating oxygen-derived free radical production in neutrophil-induced tissue injury (Pieper and Gross, 1992). Thus, K_{ATP} channel activation may offer a protective mechanism against injury processes by inhibiting neutrophil activation and subsequent superoxide production (Akar et al., 1999).

In conclusion, we demonstrated that LPS from *E. coli* reduced gastric damage and gastric neutrophil infiltration induced by indomethacin. Glibenclamide alone, but not with diazoxide, reversed this LPS protective effect. Taken together, our data suggest that LPS has a protective effect against indomethacin-induced gastropathy, probably through activation of K_{ATP} channels.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Maria Silvandira Freire França. Grants from CNPq (Brazil) supported this work. Dr. Ribeiro and Dr. Cunha are recipients of CNPq fellowship. This work is part of the requirements to obtain a Master science degree in Pharmacology at School of Medicine, Federal University of Ceara by one of us (A S Gomes).

References

- Akar, F., Uydes-Dogan, B.S., Buharalioglu, C.K., Abban, G., Heinemann, A., Holzer, P., Van de Voorde, J., 1999. Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. *Eur. J. Pharmacol.* 25, 461–470.
- Ashley, S.W., Sonnenschein, L.A., Cheung, L.Y., 1985. Focal gastric mucosal blood flow at the site of aspirin-induced ulceration. *Am. J. Surg.* 149, 53–59.
- Bradley, P.P., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60, 618–622.
- Brayden, J.E., 2002. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 312–316.
- Calatayud, S., Canet, A., Bello, R., Hernández, C., Martí, M., Barrachina, M.D., 2003. Low endotoxemia prevents the reduction of gastric blood flow induced by NSAIDs: role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 139, 263–270.
- Castaneda, A.A., Denning, J.W., Chang, L., Mercer, D.W., 1999. Does upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) render the stomach more susceptible to damage? *J. Surg. Res.* 84, 174–179.
- Cunha, F.Q., Souza, G.E., Souza, C.A., Cerqueira, B.C., Ferreira, S.H., 1989. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. *Br. J. Exp. Pathol.* 70, 1–8.
- Cunha, F.Q., Moncadam, S., Liew, F.Y., 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 1155–1159.
- Da Silva-Santos, J.E., Santos-Silva, M.C., Cunha, F.Q., Assrey, J., 2002. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 946–951.
- Ding, S.Z., Lam, S.K., Yuen, S.T., Wong, B.C., Hui, W.M., Ho, J., Guo, X., Cho, C.H., 1998. Prostaglandin, tumor necrosis factor α and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. *Eur. J. Pharmacol.* 348 (2–3), 257–263 (May 8).
- Dunne, M.J., Petersen, O.H., 1991. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta* 7, 67–82.
- Ferraz, J.G., Sharkey, K.A., Reuter, B.K., Asfaha, S., Tingley, A.W., Brown, M.L., Mcknight, W., Wallace, J.L., 1997. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology* 113, 195–204.
- Gana, T.J., Huhlewych, R., Koo, J., 1987. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. *Ann. Surg.* 205, 399–403.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., Meixner, H., Ptak, A., Hahn, E.G., Konturek, S.J., 2001. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. *J. Physiol. Pharmacol.* 52, 611–623.
- Morrison, D.C., Ulevitch, R.J., 1978. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* 93, 526–617.

- Pieper, G.M., Gross, G.J., 1992. Anti-free-radical and neutrophil-modulating properties of the nitrovasodilator, nicorandil. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 225–232.
- Quayle, J.M., Bonev, A.D., Brayden, J.E., Nelson, M.T., 1995. Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.* 269, 1112–1118.
- Peskar, B.M., Ehrlich, K., Peskar, B.A., 2002. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 969–974.
- Pearson, J.M., Schultze, A.E., Jean, P.A., Roth, R.A., 1995. Platelet participation in liver injury from gram-negative bacterial lipopolysaccharide in the rat. *Shock* 4, 178–186.
- Ribeiro, R.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1991. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology* 73, 472–477.
- Rocha, N.P., Ferreira, S.H., 1986. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. *Eur. J. Pharmacol.* 11, 87–92.
- Rosenbaum, J.T., Hartiala, K.T., Webster, R.O., Howes Jr., E.L., Goldstein, I.M., 1983. Anti-inflammatory effects of endotoxin. Inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte responses to complement (C5)-derived peptides in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* 113, 291–299.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Giansanti, M., Brunori, P.M., Di Matteo, F.M., Morelli, A., 1994. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 35, 909–915.
- Seino, S., 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 337–362.
- Sim, J.H., Yang, D.K., Kim, Y.C., Park, S.J., Kang, T.M., So, I., Kim, K.W., 2002. ATP-sensitive K(+) channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in guinea pig gastric myocytes. *Am. J. Physiol.* 282, 137–144.
- Souza, M.H., Troncon, L.E., Cunha, F.Q., Oliveira, R.B., 2003. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1383–1390.
- Souza, M.H., Lemos, H.P., Oliveira, R.B., Cunha, F.Q., 2004. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut* 53, 791–796.
- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., Nelson, M.T., 1989. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 14, 177–180.
- Sugita, H., Kaneki, M., Tokunaga, E., Sugita, M., Koike, C., Yasuhara, S., Tompkins, R.G., Martín, J.A., 2002. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am. J. Physiol., Endocrinol Metabol.* 28, 386–394.
- Takeuchi, K., Okada, M., Niida, H., Okabe, S., 1990. Possible mechanisms involved in gastric hypermotility caused by indomethacin in the rat. Role of glycoprivic response. *Dig. Dis. Sci.* 35, 984–992.
- Takeuchi, K., Niida, H., Ohuchi, T., Okabe, S., 1994. Influences of urethane anesthesia on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. Relation to blood glucose levels. *Dig. Dis. Sci.* 39, 2536–2542.
- Tavares-Murta, B.M., Machado, J.S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2001. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. *Inflammation* 25, 247–253.
- Thomazzi, S.M., Souza, M.H., Melo-Filho, A.A., Hewlett, E.L., Lima, A.A., Ribeiro, R.A., 1995. Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* blocks neutrophil migration and neutrophil-dependent edema in response to inflammation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 120–124.
- Vaananen, P.M., Meddings, J.B., Wallace, J.L., 1991. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am. J. Physiol.* 261, 470–475.
- Wagner, J.G., Harkema, J.R., Roth, R.A., 2002. Pulmonary leukostasis and the inhibition of airway neutrophil recruitment are early events in the endotoxemic rat. *Shock* 17, 151–158.
- Wallace, J.L., 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 112, 1000–1016.
- Wallace, J.L., Keenan, C.M., Granger, D.N., 1990. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am. J. Physiol.* 259, 462–467.
- Wallace, J.L., Arfors, K.E., McKnight, G.W., 1991. A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology* 100, 878–883.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)